



**Evaluación del efecto citotóxico de péptidos derivados de la
secuencia LfcinB (21-25)_{Pal}: RWQWRWQWR frente a líneas
celulares humanas derivadas de cáncer de mama**

Andrea Carolina Barragán Cárdenas

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias, Departamento de Química
Bogotá, Colombia

2019

Evaluación del efecto citotóxico de péptidos derivados de la secuencia LfcinB (21-25)_{pal}: RWQWRWQWR frente a líneas celulares humanas derivadas de cáncer de mama

Andrea Carolina Barragán Cárdenas

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:

Magister en Ciencias - Bioquímica

Director: Javier Eduardo García Castañeda

Ph.D. Ciencias Química

Grupo de Investigación:

Síntesis y Aplicación de Moléculas Peptídicas

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias, Departamento de Química

Bogotá, Colombia

2019

A mis padres y hermanos.

*Lo bueno de la ciencia es que es cierta
independientemente de si crees o no en ella.*

Neil deGrasse Tyson

Agradecimientos

A la Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias y Programa de Maestría en Ciencias – Bioquímica, por la financiación dentro de la Beca de Exención de Derechos Académicos y por permitirme el desarrollo de mis estudios e investigación de maestría.

A mi director, Javier Eduardo García Castañeda quien ha guiado el desarrollo de este trabajo y me ha brindado su apoyo, confianza y dedicación durante este proceso académico. De igual forma, a la profesora Zuly Jenny Rivera Monroy quien acompañó este proceso con su constante asesoría y consejos.

Al grupo de investigación Síntesis y Aplicación de Moléculas Peptídicas y sus integrantes quienes siempre estuvieron dispuestos a ayudar con la culminación de este proyecto.

A los profesores Adriana Umaña Pérez y Mauricio Urquiza Martínez, quienes junto con los integrantes del Grupo de Investigación en Hormonas me abrieron las puertas a su laboratorio, aconsejaron, aportaron y guiaron durante este proceso,

Al profesor Jean Paul Vernot e integrantes del grupo de Fisiología Celular y Molecular, quienes fueron fundamentales en el desarrollo de esta investigación.

A COLCIENCIAS, por la financiación del proyecto de investigación “Desarrollo de un medicamento contra el cáncer de mama basado en un péptido polivalente derivado de la LfcinB - Estudio de la fase pre-clínica (fase cero): caracterización fisicoquímica de un lote del fármaco para estudios pre-clínicos", Código: 110180762973, contrato 706-2018

A mis padres y hermanos, quienes son el motor de mi vida y con su constante amor me apoyaron en este camino.

Resumen

El cáncer de mama actualmente presenta la mayor incidencia y mortalidad en mujeres a nivel mundial, los diferentes tratamientos para esta enfermedad son altamente invasivos afectando tanto la calidad de vida como la autoestima de los pacientes. Es por esto, que se requieren nuevos abordajes terapéuticos con mayor selectividad que no induzcan resistencia ni generen efectos adversos. Dentro de este contexto surgen los péptidos antimicrobianos (AMPs) los cuales han presentado efecto citotóxico contra células cancerosas; el péptido palindrómico derivado de lactoferricina bovina LfcinB (21-25)_{pal}: ¹RWQWRWQWR⁹ ha presentado actividad anticancerígena contra líneas celulares humanas derivadas de cáncer oral y de mama. En este trabajo se evaluó el efecto citotóxico de péptidos análogos de la secuencia palindrómica (scan de Alaninas) frente a líneas derivadas de cáncer de mama MDA-MB-468, MDA-MB-231, MCF-7 y cultivo primario de fibroblastos, determinando que el efecto citotóxico se ve disminuido por la modificación de cualquiera de los residuos de la secuencia. El péptido palindrómico generó efecto citotóxico selectivo sobre las líneas celulares evaluadas con cambios morfológicos característicos de apoptosis. Además, se evaluó de manera preliminar el tipo de muerte celular generada por este péptido contra la línea celular MCF-7 mediante citometría de flujo y cambio en la expresión génica relativa, permitiéndonos determinar que su efecto está mediado mayoritariamente por procesos apoptóticos. Este trabajo permitió identificar un péptido citotóxico y selectivo contra líneas celulares derivadas de cáncer de mamá, cuya secuencia puede ser considerada promisoría para el desarrollo de agentes terapéuticos.

Palabras clave: Lactoferricina bovina, péptido palindrómico, cáncer de mama, selectividad, citotoxicidad.

Abstract

Breast cancer currently has the highest incidence and mortality in women worldwide, the different treatments for this disease are highly invasive affecting both the quality of life and the self-esteem of patients. That is why new therapeutic approaches with greater selectivity which do not induce resistance or generate adverse effects are required. Within this context, antimicrobial peptides (AMPs) arise which have had a cytotoxic effect against cancer cells; palindromic peptide derived from bovine lactoferricin LfcinB (21-25)_{Pal}: ¹RWQWRWQWR⁹ has presented anticancer activity against human cell lines derived from oral and breast cancer. In this work, the cytotoxic effect of peptide analogs of the palindromic sequence (Alanine scan) was evaluated against lines derived from breast cancer MDA-MB-468, MDA-MB-231, MCF-7 and primary fibroblast culture, determining that the cytotoxic effect is diminished by the modification of any of the sequence residues. The palindromic peptide generated a selective cytotoxic effect on cell lines evaluated with morphological changes characteristic of apoptosis. In addition, the mechanism of action of this peptide against the MCF-7 cell line was evaluated preliminary by flow cytometry and change in relative gene expression, supporting us to determine that its effect is mediated by apoptotic processes. This work allowed to identify a cytotoxic and selective peptide against cell lines derived from breast cancer, whose sequence can be considered promising for the development of therapeutic agents.

Keywords: Bovine lactoferricin, palindromic peptide, breast cancer, selectivity, cytotoxicity.

Contenido

	Pág.
Resumen	IX
Lista de figuras.....	XV
Lista de tablas.....	XVII
Lista de Símbolos y abreviaturas.....	XIX
Introducción	1
1. Marco teórico.....	5
1.1 Cáncer de mama	5
1.2 Péptidos anticancerígenos	8
1.3 Lactoferrina & Lactoferricina	10
1.4 Péptidos derivados de LfcinB en cáncer	12
1.5 ACPs palindrómicos.....	13
1.6 Scan de Alaninas	14
1.7 Generalidades de las líneas celulares	15
1.7.1 MDA-MB-468 (ATCC® HTB-132™).....	15
1.7.2 MDA-MB-231 (ATCC® HTB-26™).....	15
1.7.3 MCF-7 (ATCC® HTB-22™).....	16
1.7.4 Fibroblastos.....	16
2. Justificación.....	17
3. Métodos.....	23
3.1 Materiales y reactivos.....	24
3.2 Cultivo celular	24
3.2.1 Descongelamiento	24
3.2.2 Subcultivo.....	24
3.2.3 Criopreservación	25
3.2.4 Determinación de densidad celular óptima para ensayos de toxicidad	25
3.3 Efecto citotóxico de los péptidos	25
3.3.1 Ensayo de viabilidad celular MTT.....	25
3.3.2 Microscopía de contraste de fases	26
3.3.3 Detección lactato deshidrogenasa.....	26
3.4 Citometría de flujo	27

3.4.1	Ensayo Apoptosis/Necrosis	27
3.4.2	Evaluación de membrana citoplasmática	28
3.4.3	Determinación despolarización de membrana mitocondrial	28
3.5	Determinación de la expresión de los genes que codifican las proteínas pro y anti-apoptóticas.....	29
3.5.1	Extracción RNA con TRIzol®	29
3.5.2	Retrotranscripción.....	29
3.5.3	PCR en tiempo real.....	30
4.	Resultados y Discusión.....	33
4.1	Caracterización de los péptidos	33
4.2	Efecto citotóxico de LfcinB (21-25) _{Pal} y análogos	38
4.2.1	Determinación de densidad celular óptima para ensayos de toxicidad	38
4.2.2	Efecto citotóxico de los péptidos	39
4.2.2.1	Viabilidad celular en líneas celulares derivadas de cáncer de mama	39
4.2.2.2	Viabilidad celular en cultivo primario de fibroblastos humanos normales	44
4.3	Detección Lactato Deshidrogenasa.....	48
4.4	Estudio preliminar del mecanismo de acción de LfcinB (21-25) _{Pal}	49
4.4.1	Afectación de la membrana plasmática.....	49
4.4.2	Determinación apoptosis/necrosis	51
4.4.3	Despolarización de membrana mitocondrial	54
4.4.4	Cambio en la expresión relativa de genes pro y anti apoptóticos	56
5.	Conclusiones	59
	Anexo 1: Curvas de calibración de las diferentes líneas celulares, ensayo por MTT.....	61
	Anexo 2: Efecto del péptido LfcinB(21-25)_{Pal} sobre las células evaluadas	62
	Anexo 3: Efecto del péptido [¹Ala] LfcinB(21-25)_{Pal} sobre las células evaluadas.....	64
	Anexo 4: Efecto del péptido [²Ala] LfcinB(21-25)_{Pal} sobre las células evaluadas.....	65
	Anexo 5: Efecto del péptido [³Ala] LfcinB(21-25)_{Pal} sobre las células evaluadas.....	66
	Anexo 6: Efecto del péptido [⁴Ala] LfcinB(21-25)_{Pal} sobre las células evaluadas.....	67
	Anexo 7: Efecto del péptido [⁵Ala] LfcinB(21-25)_{Pal} sobre las células evaluadas.....	68
	Anexo 8: Efecto del péptido [⁶Ala] LfcinB(21-25)_{Pal} sobre las células evaluadas.....	69
	Anexo 9: Efecto del péptido [⁷Ala] LfcinB(21-25)_{Pal} sobre las células evaluadas.....	70
	Anexo 10: Efecto del péptido [⁸Ala] LfcinB (21-25)_{Pal} sobre las células evaluadas.....	71
	Anexo 11: Efecto del péptido [⁹Ala] LfcinB (21-25)_{Pal} sobre las células evaluadas.....	72
	Anexo 12: Curva de calibración NADH.....	73
	Anexo 13: Citometría de flujo apoptosis/necrosis en fibroblastos tratados con el péptido LfcinB (21-25)_{Pal} a 200 µg/mL por 2 horas.....	74

Anexo 14: Análisis de expresión relativa de genes en MCF-7 por método Livak.....	75
Anexo 15: Análisis de expresión relativa de genes en fibroblastos por método Livak	77
Bibliografía	81

Lista de figuras

Pág.

Figura 1. Estructura de la LfcinB, los residuos de carga positiva se muestran en rojo, la numeración corresponde a la posición de los aminoácidos en la proteína. Modificado de [1].....8

Figura 2. Mecanismo propuesto de acción de LfcinB "En el diagrama LfcinB se une a la membrana y en el citoplasma mediante la formación de poros. Se co-localiza con las mitocondrias y causa la liberación de citocromo C. El citocromo C interactúa con Apaf-1 y caspasa-9 para formar el apoptosoma. Caspasa-9 luego activa la caspasa 3 que finalmente conduce a la apoptosis". Modificado de [2].....9

Figura 3. Péptido palindrómico derivado de la lactoferricina bovina [3].....11

Figura 4. Proyecciones de rueda helicoidal de los péptidos evaluados en este estudio.....27

Figura 5. Espectro de dicroísmo circular (CD) del péptido sintético LfcinB (21-25)_{Pal}.....28

Figura 6. Espectro de dicroísmo circular (CD) de los péptidos análogos generados por Scan de Alaninas del péptido LfcinB (21-25)_{Pal}.....28

Figura 7. Efecto citotóxico del péptido LfcinB (21-25)_{Pal} a 24 horas de incubación sobre la viabilidad celular de las líneas celulares MDA-MB-468, MDA-MB-231 y MCF7. S.E \pm n=3.

Cambios morfológicos registrados con microscopía de contraste bajo iguales condiciones de ensayo a 20x.....31

Figura 8. Efecto de los péptidos análogos sobre la viabilidad celular de las líneas celulares MDA-MB-468, MDA-MB-231 y MCF7 a 24 horas de incubación. S.E $\pm n=3$32

Figura 9. Microfotografías representativas de las líneas celulares derivadas de cáncer de mama sin tratamiento (control), y tratadas con: (i) [⁹Ala] LfcinB (21-25)_{Pal} (cambio de Arg por Ala); (ii) [⁷Ala] LfcinB (21-25)_{Pal} (cambio de Gln por Ala) y [²Ala] LfcinB (21-25)_{Pal} (cambio de Trp por Ala). Los péptidos fueron usados a 200 $\mu\text{g/mL}$ y 24 horas de incubación.....33

Figura 10. Efecto citotóxico del péptido LfcinB (21-25)_{Pal} a 2, 24 y 48 horas de incubación sobre la viabilidad celular de un cultivo primario de fibroblastos humanos. S.E $\pm n=3$. Cambios morfológicos registrados con microscopía de contraste bajo iguales condiciones de ensayo a 20x.....35

Figura 11. Efecto de los péptidos análogos sobre la viabilidad de cultivo primario de fibroblastos humanos a 2, 24 y 48 horas de incubación. S.E $\pm n=3$36

Figura 12. Microfotografías del efecto de los péptidos análogos sobre la morfología de un cultivo primario de fibroblastos a 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$ y 24 horas de incubación.....37

Figura 13. Plots representativos de la determinación de integridad de membrana de MCF-7 mediante citometría de flujo donde M.C. corresponde a porcentaje eventos con membrana comprometida y M.I. a porcentaje de eventos con membrana íntegra. Control negativo; Células sin tratamiento. Control positivo: células tratadas con actinomicina 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Péptido: LfcinB (21-25)_{Pal} 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$ a 2 horas.....39

Figura 14. Efecto sobre la membrana citoplasmática de MCF.7 medido por citometría de flujo, las barras rojas representan eventos de membrana comprometida y las azules de membrana íntegra. Control negativo; Células sin tratamiento. Control positivo: células tratadas con actinomicina 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Péptido: LfcinB (21-25)_{Pal} 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$ a 2 horas. \pm S.D (n=3) ANOVA Post hoc Tukey. ^a $p < 0.001$ y ^b $p < 0.005$ diferencias estadísticamente significativas respecto al control negativo.....40

Figura 15. Ensayo de citometría de flujo para determinación de apoptosis y necrosis en células MCF-7 tratadas con el péptido LfcinB (21-25)_{Pal} a 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$ por 2 horas. **A.** Histogramas representativos del cambio en la fluorescencia de los tratamientos evaluados células no tratadas (rojo), células tratadas con doxorubicina 10 nM (azul) y células tratadas con péptido (naranja). **B.** Plots representativos de los tratamientos frente a los canales de

7-AAD y Anexina-V, Q1: eventos en apoptosis temprana, Q2: eventos en apoptosis tardía, Q3: eventos en necrosis y Q4: eventos vivos.....41

Figura 16. Plots representativos de la determinación de cambio en el potencial de membrana mitocondrial de MCF-7 mediante citometría de flujo. Control negativo; Células sin tratamiento. Control positivo: células tratadas con actinomicina $10 \mu\text{g mL}^{-1}$. Péptido: LfcinB (21-25)_{Pal} $200 \mu\text{g mL}^{-1}$ a 2 horas.....43

Figura 17. Efecto sobre el potencial de membrana mitocondrial de MCF.7 medido por citometría de flujo, las barras rojas representan eventos de polarización y las azules de despolarización. Control negativo; Células sin tratamiento. Control positivo: células tratadas con actinomicina $10 \mu\text{g mL}^{-1}$. Péptido: LfcinB (21-25)_{Pal} $200 \mu\text{g mL}^{-1}$ a 2 horas. \pm S.D (n=3) ANOVA Post hoc Tukey. ^a $p < 0.05$ diferencias estadísticamente significativas respecto al control negativo.....44

Figura 18. Cambio en la expresión relativa de genes pro y anti-apoptóticos en células MCF-7 y fibroblastos como respuesta a la exposición a $200 \mu\text{g mL}^{-1}$ LfcinB (21-25)_{Pal} por 2 y 24 horas. \pm S.D (n=2) ANOVA Post hoc Tukey. ^a $p < 0.0001$, ^b $p < 0.0005$ y ^c $p < 0.005$ diferencias estadísticamente significativas respecto al control.....46

Lista de tablas

Pág.

Tabla 1: Péptidos derivados de LfcinB (21-25) _{Pal}	17
Tabla 2: Primers empleados en la amplificación de genes pro y anti apoptóticos.....	23
Tabla 3: Propiedades fisicoquímicas de los péptidos evaluados.....	26

Tabla 4. Resultados de las curvas de calibración obtenidas con cada modelo celular.....29

Tabla 5. Parámetros de extracción de RNA.....45

.

Lista de Símbolos y abreviaturas

Símbolo	Término
ABS	Absorbancia
ACPs	Péptidos anticancerígenos
Ala (A)	Alanina
AMPs	Péptidos antimicrobianos
Arg (R)	Arginina
ATCC	American Type Culture Collection
DC	Dicroísmo circular
DMSO	Dimetilsulfóxido
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético
ER	Receptores de estrógeno
Gln (Q)	Glutamina
HER2	Receptor del factor de crecimiento epidérmico humano
IP	Yoduro de propidio
LF	Lactoferrina
LFB	Lactoferrina bovina
Lfcin	Lactoferricina
LfcinB	Lactoferricina bovina
MIC	Concentración mínima inhibitoria
MTT	Bromuro de 3-4,5dimetiltiazol-2-ilo-2,5-difeniltetrazol
NIH	Instituto Nacional de Salud de los Estados Unidos
OMS	Organización Mundial de la Salud
OSCC	Cáncer oral de células escamosas
PR	Receptores de progesterona
SAMP	Síntesis y Aplicación de Moléculas Peptídicas
SAR	Relación estructura actividad
SFB	Suero fetal bovino
RPMI	Medio Roswell Park Memorial Institute
TA	Temperatura ambiente
TGF α	Receptor de crecimiento transformante alfa
Trp (W)	Triptófano

Introducción

El cáncer es un término designado a un amplio grupo de enfermedades caracterizadas por el crecimiento anormal de células, las cuales son capaces de mantener la señalización proliferativa, evadir los supresores del crecimiento, resistir la muerte celular, permitir la inmortalidad replicativa, inducir la angiogénesis y activar la invasión y la metástasis [4] [5]. Estas enfermedades pueden afectar cualquier parte del cuerpo y son conocidas también como tumores o neoplasias malignas, identificándose más de 100 tipos de cáncer en humanos [6].

Para finales de 2018 se estimaron 18 millones de casos de cáncer a nivel mundial, de los cuales 9.5 millones fueron diagnosticados en hombres y el 8.5 restante en mujeres [7]. Además, se ha reportado que aproximadamente 8.8 millones de personas mueren anualmente de cáncer, generando así una presión significativa sobre las poblaciones y los sistemas de salud en todos los niveles de ingresos; de forma que para 2017 se generó un compromiso a nivel mundial para invertir más en el control del cáncer como una prioridad de salud pública [8].

El cáncer de mama es uno de los cánceres con mayor incidencia a nivel mundial con aproximadamente 2.1 millones de nuevos diagnósticos para 2018 y el quinto con mayor mortalidad, reportando para el mismo año cerca de 627.000 muertes. Cuando se trata de la población femenina este tipo de cáncer es el más diagnosticado y la principal causa de muerte por cáncer; estadísticas que superan con creces las de otros tipos de cáncer en los países desarrollados y en desarrollo [9]. En Colombia la tendencia es similar ya que este cáncer es el de mayor incidencia y mortalidad en mujeres, caracterizándose además por una baja supervivencia que no ha mejorado con el tiempo, lo cual podría atribuirse a

estados muy avanzados al momento del diagnóstico o a falta de eficacia en el tratamiento. [10] [11]. Razón por la cual se ha establecido un plan nacional para el control del cáncer donde se propone lograr un nivel alto de producción científica en investigaciones sobre cáncer [12].

Los tratamientos para el cáncer de mama en la actualidad consisten en cirugía, quimioterapia, radioterapia o terapia hormonal; en aquellos casos donde el tumor es operable se realizan cirugías de remoción parcial o total del tejido mamario [13]. Estas opciones terapéuticas afectan a las células cancerosas pero su selectividad no es del 100%, causando efectos secundarios adversos en los pacientes [14]. Por esta razón es de gran importancia encontrar nuevos tratamientos que tengan mayor especificidad hacia células cancerosas y por lo tanto menos efectos secundarios.

Dentro de este contexto se han estudiado diferentes moléculas, entre las más promisorias se encuentran los péptidos antimicrobianos (AMPs). Algunos AMPs presentan carga neta catiónica y características anfipáticas que les confieren (i) capacidad de interacción con la membrana bacteriana desestabilizándola mediante la formación septos, (ii) inhibición de la síntesis de pared celular, de ácidos nucleicos y proteínas, entre otros [15] [16]. A partir de estos, se ha identificado un grupo que presenta actividad anticancerígena y son denominados péptidos anticancerígenos (ACPs) que tienen inmenso potencial para el desarrollo de métodos de diagnóstico y terapias de cáncer. Estas moléculas imitan las propiedades de las proteínas naturales mejorando o inhibiendo la señalización, lo que permite dirigir la terapia específicamente a células cancerosas, o usándolas como una herramienta para la entrega de fármacos en la célula diana [17].

En este trabajo se evaluó el efecto citotóxico del péptido palindrómico LfcinB (21-25)_{Pal}: ¹RWQWRWQWR⁹ y sus análogos, en los que se cambió de manera secuencial cada aminoácido por el residuo de Alanina (scan de Alaninas) frente a las líneas celulares de cáncer de mama MDA-MB-461, MDA-MB-231, MCF-7 y frente a un cultivo primario de

fibroblastos humanos normales, para identificar los aminoácidos críticos en la actividad citotóxica. Además, se evaluó de forma preliminar el tipo de muerte celular asociado al efecto del péptido palindrómico evidenciando mayor generación de eventos apoptóticos. Los resultados obtenidos son promisorios y se obtiene una molécula peptídica que podría continuar en el proceso del desarrollo de un fármaco para el tratamiento del cáncer de mama.

1. Marco teórico

1.1 Cáncer de mama

A nivel mundial, el cáncer de mama es el segundo tipo de cáncer con mayor incidencia (11.6%) y el quinto con mayor mortalidad (6.6%) sin discriminación de género. Cuando se evalúa la población femenina, esta es la principal causa de muerte por cáncer con más de 626.000 muertes reportadas para finales de 2018 y el que presenta mayor incidencia con cerca de 2.100.000 nuevos casos para este mismo año [18]. Las tasas de incidencia y mortalidad van en aumento, de tal forma que se espera que para el 2030 en América Central y Sudamérica la incidencia alcance el 70%. Por lo que es urgente generar nuevas estrategias de detección temprana y tratamientos más eficientes [19] [20].

Desde 2010 el cáncer de mama ha sido la principal causa de muerte por cáncer en las mujeres colombianas y el número de casos ha ido en incremento, ya que se pasó de 46,61 casos por 100.000 habitantes en el 2010 a 48,05 en 2014 (aumento del 11,86%); de igual forma, la tasa de mortalidad pasó de 12,58 en el 2010 a 13,09 por 100.000 habitantes en 2014, donde el 87% de las muertes fueron de mujeres mayores de 45 años [21]. Razón por la cual desde el 2014 el cáncer de mama ha ocupado el primer lugar entre los tumores malignos más frecuentes en la población general (14%) y entre las mujeres (22%) [22].

La glándula mamaria está compuesta principalmente por dos tejidos; el tejido glandular que alberga las glándulas productoras de leche (lóbulos) y los conductos lácteos, y el tejido estromal que incluye tejido conectivo graso y fibroso. Además, presenta inervación de tejido linfático que elimina los líquidos y desechos celulares [23]. El cáncer de mama se refiere a los cánceres que se originan en el tejido mamario, allí las células cancerosas se

forman a partir de células normales debido a mutaciones en el DNA o RNA que pueden ocurrir de forma espontánea o inducidas por diferentes factores como radiación nuclear, radiación electromagnética, virus, bacterias y hongos, parásitos, entre otros [24].

La mayoría de los cánceres de mama se originan en las células que recubren los conductos (adenocarcinoma ductal) o en las células que recubren los lóbulos (adenocarcinoma lobular), ambos se pueden presentar de forma *in situ* o de forma invasiva cuando se ha extendido a otras zonas; con menor incidencia se han descrito otros tipos de cáncer que afectan otros tejidos como carcinoma inflamatorio de seno, enfermedad de Paget, angiosarcoma de mama, tumores filoides, carcinoma cribiforme, carcinoma papilar, carcinoma mucinoso y carcinoma medular [23] [25] [26].

Los cánceres de mama también son clasificados de acuerdo a su expresión génica en cuatro tipos moleculares: (i) luminal, los cuales se caracterizan por presentar receptores de estrógeno, el subtipo luminal A presenta una alta expresión de genes relacionados con los receptores hormonales y baja expresión de genes relacionados con la proliferación celular, mientras que el luminal B posee niveles menores de receptores de estrógeno y altos niveles de genes de proliferación. (ii) Similar a basal, estos son negativos para receptores de estrógeno, progesterona y HER2/neu, y expresa genes asociados a células mioepiteliales cuyo inmunofenotipo corresponde a CK5, CK17, c-kit, factores de crecimiento de hepatocito e insulina, calponina 1, caveolina y laminina. (iii) Similar a normal, sobre expresan genes normalmente expresados en el tejido adiposo y baja expresión de genes epiteliales luminales. (iv) HER2/ERBB2, este tipo sobre expresa HER2/neu, el protooncogén ERBB2, genes de proliferación y presenta escasos genes asociados al fenotipo luminal [27] [28].

Los tratamientos convencionales para este cáncer son cirugía, quimioterapia, radioterapia y el tratamiento hormonal; sin embargo, estos tratamientos son invasivos y generalmente causan efectos adversos como respuestas emocionales relacionadas con el miedo y dolor afectando la autoestima y la calidad de vida de los pacientes [22] [25].

Las cirugías más frecuentes son la lupectomía y la mastectomía, en la primera se extirpa el tumor dejando parte del tejido mamario intacto, mientras en la segunda se extirpa por completo el tejido mamario. Estas cirugías incrementan la expectativa y la calidad de vida, sin embargo, son procesos invasivos con severas secuelas psicológicas y reacciones adversas como dolor, malestar en el área del pecho, etc. [13] [29].

La radioterapia consiste en la aplicación de radiaciones ionizantes en la mama o en la pared torácica y en ocasiones en las cadenas ganglionares a las que drena (axila y cadenas supraclaviculares). Se utiliza generalmente para destruir células cancerosas que han quedado tras la operación reduciendo alrededor del 70% el riesgo de recurrencia y mejora la supervivencia [30] [31]. Este tratamiento no es selectivo y puede producir reacciones adversas como inflamación, dolor, pérdida de cabello en el área, fatiga, cansancio, entre otras [14].

A pesar de la creciente demanda de cirugías, la quimioterapia sigue siendo la principal modalidad adyuvante sistémica siendo clave para el aumento en la supervivencia. Este tratamiento se basa en la administración de fármacos capaces destruir las células cancerosas que han podido dispersarse por el organismo, a las que ni la cirugía ni la radioterapia pueden alcanzar [30]. Los efectos secundarios de la quimioterapia pueden afectar negativamente la calidad de vida del paciente ya que incluyen alopecia, náuseas y vómitos, fatiga, molestias musculares, trastornos intestinales y mielosupresión, entre otros [32].

La terapia hormonal permite ralentizar o detener el crecimiento del tumor al bloquear la capacidad del cuerpo de producir hormonas o al interferir con los efectos de estimulación de las hormonas sobre las células cancerosas [33] [34]. Sin embargo, este tratamiento presenta algunos efectos secundarios como lo son fatiga, cambios de humor, dolor muscular, entre otros, incluso aumentando el riesgo a generar coágulos sanguíneos y cáncer endometrial [35].

Debido a esto, es imperioso generar nuevas estrategias para fortalecer los sistemas de salud; es decir, nuevos y más eficaces métodos de detección temprana y desarrollar nuevos fármacos que sean selectivos, eficaces y que no generen reacciones adversas severas. Los tratamientos deben ser no invasivos y que no comprometan significativamente la calidad de vida del paciente. Los péptidos sintéticos pueden ser considerados como candidatos viables para el desarrollo de fármacos de uso oncológico debido a que (i) no inducen reacciones adversas, (ii) son inocuos, (iii) versatilidad en la vía de administración, (iv) económicos permitiendo mayor cobertura, entre otros.

1.2 Péptidos anticancerígenos

La supervivencia de los seres vivos depende de los mecanismos de defensa usados por este para su protección contra los patógenos. En primera estancia actúan los mecanismos innatos de inmunidad, seguido por respuestas inmunes adquiridas que implican la activación de las células T y B. Los péptidos endógenos, que se expresan o inducen constitutivamente, proporcionan un medio de defensa rápido y eficaz contra el patógeno [36].

Estos péptidos son conocidos como péptidos antimicrobianos (AMPs), son moléculas heterogéneas las cuales pueden ser clasificadas de acuerdo a su estructura secundaria α -hélice, hoja β o random coil [37]; sin embargo, generalmente son catiónicos con una carga neta de +2 a +9, anfipáticos, de corto tamaño entre 5 y 40 residuos, y su mecanismo de acción es afectar la membrana celular de los microorganismos, lo que conduce a la lisis celular y la muerte [38]. Se ha observado que algunos AMPs actúan sobre dianas intracelulares para inhibir la síntesis de proteínas, la síntesis de ácidos nucleicos o alterar el metabolismo celular [39]. La mayoría de los AMPs tienen la capacidad de inducir muerte en bacterias tanto Gram-positivas como Gram-negativas, pero se ha observado que algunos, además tienen la capacidad de afectar células cancerosas por lo que se les ha denominado péptidos anticancerígenos (ACPs) [38].

El efecto ejercido por los ACPs ha sido relacionado con características que comparten las células cancerosas y las bacterias que las diferencian de las células normales; la membrana de las células cancerosas se encuentra cargada negativamente debido a la distribución asimétrica en la capa externa de fosfatidilserina, mucinas glicosiladas, gangliósidos sialilados y heparina sulfato [40]. De igual forma hay otros elementos que contribuyen a la selección preferencial de las células cancerosas por los ACPs como la fluidez de la membrana y el área de la superficie celular [38]. Sin embargo, la densidad de carga negativa (debido a un solo grupo fosfato en PS) en las células cancerosas es relativamente menor en comparación con las cargas negativas (debido a múltiples grupos fosfato en LPS, LTA, además de un grupo fosfato en PS) en las membranas de las células bacterianas. De forma que la afinidad de AMPs por las células cancerosas es inherentemente más débil que la afinidad por las bacterias [41].

Se ha evidenciado que los ACPs reconocen de manera selectiva a las células cancerosas mediante interacciones electrostáticas con la membrana celular, seguido pueden inducir la muerte bajo los tres principales mecanismos de disrupción de membrana: (i) Modelo de barril, los péptidos se insertan de forma perpendicular en la membrana generando poros transmembranles. (ii) Modelo de poro toroidal, los péptidos se insertan en la membrana aumentando la tensión de curvatura y generando poros toroidales. (iii) Modelo de alfombra, el péptido se ubica sobre la membrana hasta que llega a la concentración crítica que induce la ruptura de la membrana lipídica y la formación de micelas. Aparte de estos mecanismos, se puede dar la traslocación del péptido al citoplasma dirigiéndose a una diana intracelular afectando la síntesis de proteínas, DNA o RNA, el plegamiento protéico, la actividad enzimática, entre otros, induciendo apoptosis [38] [41] [37].

Además de la selectividad de los ACPs, los péptidos como tratamiento anticancerígeno presentan otras ventajas ya que debido a su pequeño tamaño son más económicos de producir, tienen buena solubilidad en sistemas acuosos, presentan menos efectos secundarios y baja toxicidad considerándolos seguros, tienen un corto periodo de

interacción lo que disminuye la probabilidad de generar resistencia. Razones por las que estos péptidos poseen alto potencial de uso en múltiples vías de aplicaciones clínicas [42].

1.3 Lactoferrina & Lactoferricina

La Lactoferrina (LF) es una glicoproteína perteneciente a la familia de las transferrinas, encontrada en la mayoría de los fluidos de mamíferos y es liberada por los gránulos de neutrófilos durante la respuesta inflamatoria. Tiene la capacidad de activar las células asesinas naturales (NK), los leucocitos polimorfonucleares y las células asesinas activadas por linfoquinas, entre otros mecanismos de defensa primaria. También ha presentado actividad antibacteriana, antiparasitaria, antiviral, antifúngica y anticancerígena [43] [44].

La Lactoferrina bovina (LFB) tiene un peso molecular de 78 KDa, punto isoelectrico de 8,8 y está constituida por 689 aminoácidos [44]. La proteína posee aminoácidos con cadenas laterales básicas lo que le confiere la actividad; donde se destaca el dominio catiónico de la región N-terminal denominado Lactoferricina Bovina (LfcinB) que es obtenido por la hidrólisis ácida de la proteína con la pepsina gástrica [45] [46].

La LfcinB consta de 25 aminoácidos (¹⁷FKCRRWQWRMKKLGAPSITCVRRAF⁴¹) el cual presenta un bucle formado por un puente disulfuro entre las cisteínas 19-36 (Fig. 1). A diferencia de la LFB, esta no tiene la capacidad de captar Fe³⁺ pero posee propiedades antimicrobianas y anticancerígenas; donde la secuencia ²⁰RRWQR²⁵ ha sido identificada como el motivo mínimo de actividad [47] [48].

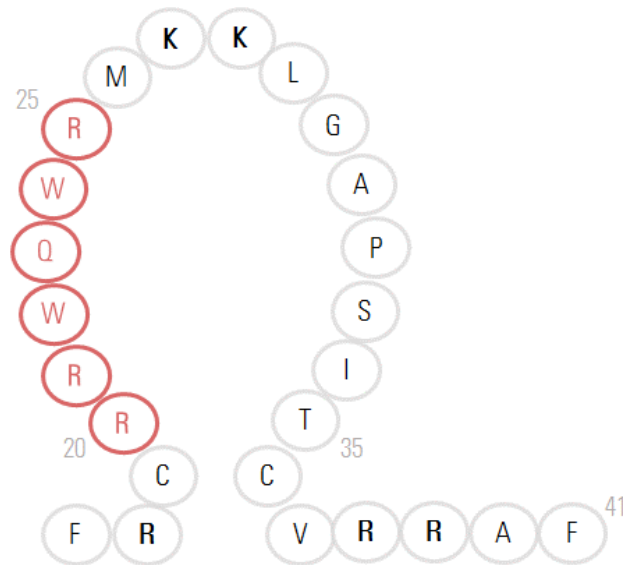


Figura 1. Estructura de la LfcinB, los residuos de carga positiva se muestran en rojo, la numeración corresponde a la posición de los aminoácidos en la proteína. Modificado de [1].

El efecto citotóxico de la LfcinB puede estar mediado por diferentes mecanismos dependiendo del tipo de célula diana y/o de la concentración del péptido. Puede generar arresto en el ciclo celular evidenciado en células CaCo-2, inducir apoptosis en células de cáncer de mama (MDA-MB-231, MCF-7, T-47D, MDA-MB-435, HS578T, T-47D), linfoma humano (Jurkat), leucemia (HL-60), entre otras. También puede inducir necrosis en neuroblastoma (SK-N-DZ, IMR-32), carcinoma de células escamosas orales (CAL27) y fibrosarcoma (Meth A) [49].

Estudios previos han demostrado que LfcinB no ha presentado efecto citotóxico *in vitro* en cultivos primarios de linfocitos, fibroblastos y células endoteliales humanas; mientras que en líneas celulares de carcinoma derivadas de tumores malignos de mama, colon y ovarios fue capaz de inducir apoptosis [50]. Se ha propuesto que el efecto del péptido en células T-leucemia involucra la unión del péptido a la membrana causando la formación de un poro transmembranal que permite su entrada hacia la membrana mitocondrial. La activación de Bax/Bak conlleva a la liberación del citocromo C que interactuará con Apaf-1 para iniciar la formación del apoptosoma que reconocerá la procaspasa 9. Luego se produce la activación de las caspasas efectoras llevando finalmente a la muerte celular por apoptosis (Fig. 2.).

Sin embargo, se ha sugerido que la citotoxicidad generada por LfcinB puede ser mediada por la inducción de apoptosis o necrosis dependiendo de la concentración del péptido [2].

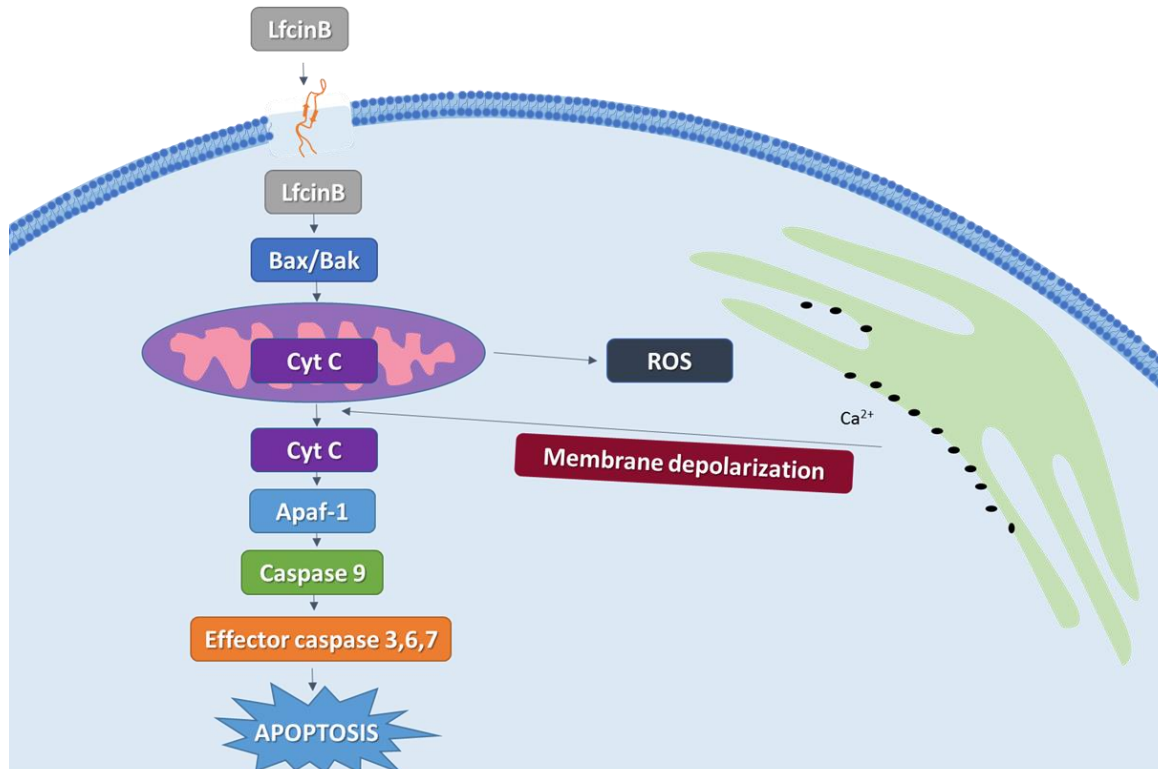


Figura 2. Mecanismo de acción propuesto de LfcinB. La LfcinB se une a la membrana e ingresa al citoplasma mediante la formación de poros. Se co-localiza con las mitocondrias y causa la liberación de citocromo C, el cual interactúa con Apaf-1 y caspasa-9 para formar el apoptosoma. Luego se activa la caspasa 3 que finalmente conduce a la apoptosis. Modificado de [2].

1.4 Péptidos derivados de LfcinB en cáncer

Como previamente se ha descrito tanto la LFB como la LfcinB presentan actividad citotóxica contra diferentes líneas celulares derivadas de cáncer, y péptidos cortos derivados de LfcinB han ejercido efecto citotóxico mejorado. Dentro de estos, se reporta el péptido lineal LfcinB (17-26): ¹⁷FKCRRWQWRM²⁶ el cual, a 18 horas de tratamiento ha ejercido citotoxicidad mediante apoptosis dada por la internalización a la mitocondria, seguida de la liberación de citocromo C y especies reactivas de oxígeno en líneas celulares derivadas de cáncer de leucemia, mama, colon y ovario [50].

De igual forma los péptidos derivados del motivo mínimo de actividad como LfcinB (20-25) y LfcinB (20-30) en sus formas líneal, dimérica, tetramérica y ciclada han presentado actividad mejorada sobre las líneas celulares derivadas de cáncer de mama MDA-MB-231, MDA-MD-468 y MCF-7 y derivadas de cáncer oral escamoso CAL-27 y SCC15; donde el péptido tetramérico LfcinB (20-25)₄ disminuyó la viabilidad celular en más de un 80% en todos los casos y frente a la línea MCF-7 se evidencio que generaba mayoritariamente eventos apoptóticos [51] [52] [53] [54].

1.5 ACPs palindrómicos

Los péptidos con secuencia palindrómica son aquellos que su secuencia se puede leer idénticamente desde el extremo N-terminal o C-terminal [55]; algunos péptidos con carga positiva y organización anfipática han sido modificados para generar secuencias palindrómicas lo que les ha conferido mayor capacidad de interacción con la membrana, además de presentar baja toxicidad en células normales [56]. También se ha evidenciado que péptidos con secuencias palindrómicas son más propensos a producir translocación como mecanismo de acción para destruir la membrana de sus células blanco [57].

Diferentes reportes han demostrado que péptidos palindrómicos derivados de lactoferricina bovina (LfcinB) presentan actividad antimicrobiana mejorada; los pentapéptidos WRWRW-NH₂, RWRWR-NH₂, WRYRW-NH₂, RWWR-NH₂, WRW-OBzl presentan actividad frente a *E. coli* y *S. aureus*, y los tetra-tripéptidos contra *S. aureus* [58]. Los péptidos palindrómicos (KAAK, KKKK, KLLK, KGGK) unidos a un ácido graso han mostrado potente actividad antimicrobiana contra bacterias Gram-positivas, Gram-negativas y hongos [59]. Otros péptidos palindrómicos de mayor longitud derivados de LfcinB (18-28) han presentado actividad antimicrobiana mejorada frente a cepas de *E. coli*, *S. typhimurium*, *S. pullorum*, *S. aureus* y *S. epidermidis* además de presentar una baja citotoxicidad frente a células HEK-293 [57].

El péptido palindrómico LfcinB (21-25)_{pal}: ¹RWQWRWQWR⁹ derivado del motivo mínimo de actividad de la LfcinB ha presentado actividad antibacteriana frente a cepas de *E. coli*,

S. enteritidis y *S. maltophilia* con MICs iguales o menores a las obtenidas por los péptidos dimérico, tetramérico, cíclico y monomérico del mismo motivo activo (²⁰RRWQWR²⁵). La actividad de este péptido posiblemente se debe a que este palíndromo presenta aminoácidos hidrofóbicos como el Triptófano junto con aminoácidos polares como la Arginina que le permiten una mejor interacción con las membranas bacterianas [3]. En adición, LfcinB (21-25)_{Pal} presentó efecto citotóxico contra líneas de carcinoma de células escamosas de la cavidad oral (OSCC), especialmente en la línea celular CAL27, y líneas celulares humanas derivadas de cáncer de mama haciéndolo una molécula promisorio para futuros estudios [52] [53].

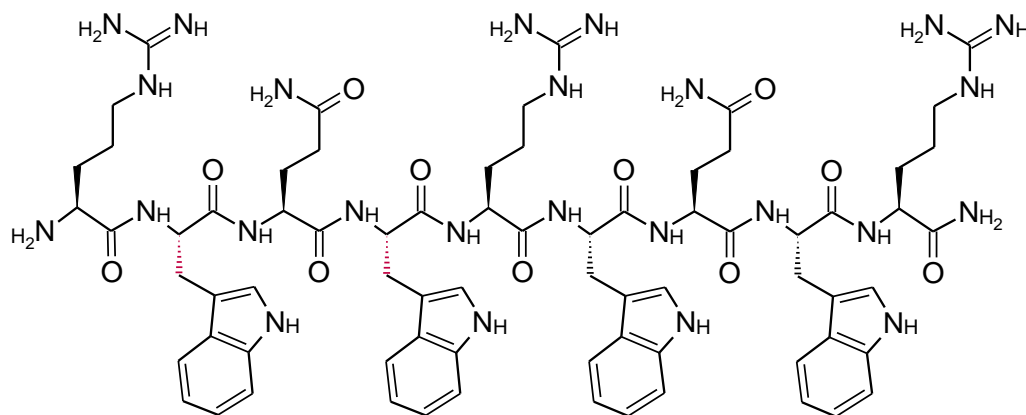


Figura 3. Péptido palindrómico derivado de la lactoferricina bovina [3].

1.6 Scan de Alaninas

Una estrategia usada regularmente para estudiar la actividad antimicrobiana y anticancerígena de los péptidos se basa en modificar su estructura primaria y realizar ensayos de estructura actividad (SAR) que generen información sobre el efecto de los cambios ejecutados [60]. El scan de Alaninas es un método que permite obtener información sobre los residuos críticos responsables de la actividad del péptido [61]. Consiste en la síntesis de péptidos en los que se sustituye cada aminoácido de la secuencia por Ala, lo que permitirá establecer cuáles cadenas laterales interactúan con la molécula diana [62] [63]. Este método ha sido de gran relevancia, ya que ha permitido identificar la

importancia de cada residuo en inhibidores de proteínas y hormonas como la endotelina, péptido vaso-intestinal, factor de crecimiento humano, interleuquina-8, así como segmentos peptídicos del factor de crecimiento humano liberador de hormonas, galanina y neurotensina [64].

1.7 Generalidades de las líneas celulares

1.7.1 MDA-MB-468 (ATCC® HTB-132™)

Línea celular de adenocarcinoma de mama derivado del derrame pleural de una mujer de raza negra de 51 años, presenta morfología epitelial adherente, expresa los receptores de factor de crecimiento epidermal (EGF) y factor de crecimiento transformante alfa (TGF α); el medio base para esta línea celular es medio L-15 de Leibovitz suplementado con suero fetal bovino (SFB) 10% [65]. Son clasificadas como células triple negativas tipo basal, las cuales presentan una frecuencia de diagnóstico de 10-20% y está relacionada con mal pronóstico [66].

1.7.2 MDA-MB-231 (ATCC® HTB-26™)

Línea celular de adenocarcinoma de mama derivado del derrame pleural de una mujer caucásica de 51 años, las células presentan morfología epitelial adherente, expresa los receptores de factor de crecimiento epidermal (EGF) y factor de crecimiento transformante alfa (TGF α) además expresa el oncogen WNT7B; el medio base para esta línea celular es medio L-15 de Leibovitz suplementado con SFB 10% [67]. Son células triple negativo tipo basal con diferenciación mesenquimal y una frecuencia de diagnóstico de 12-14%; además, es una de las líneas celulares establecidas para la investigación en cáncer a nivel mundial [66]

1.7.3 MCF-7 (ATCC® HTB-22™)

Línea celular de adenocarcinoma de mama derivado del derrame pleural de una mujer caucásica de 69 años. Las células presentan morfología epitelial adherente conservando varias características del epitelio mamario diferenciado, incluida la capacidad de procesar estradiol a través de receptores citoplásmicos de estrógenos y la capacidad de formar domos, además expresan el oncogén WNT7B. El medio para esta línea celular es el Medio Esencial Mínimo de Eagle, suplementado con 0.01 mg/mL de insulina humana recombinante; SFB 10% [68]. Estas células son clasificadas como tipo luminal A, las cuales tienen una frecuencia de diagnóstico de 50-60% y esta línea ha sido denominada como prototipo para la investigación en cáncer cuyo crecimiento característico es en colonias interconectadas de células poligonales [69]

1.7.4 Fibroblastos

Cultivo primario de fibroblastos humanos aislados de prepucio en el laboratorio de Fisiología Celular y Molecular. Son células grandes, planas, alargadas (en forma de huso) que poseen procesos que se extienden desde los extremos del cuerpo celular.

2. Justificación

El cáncer de mama es una de las principales causas de muerte de mujeres a nivel mundial y sus abordajes terapéuticos actuales como lo son la quimioterapia, radioterapia, hormonoterapia o tratamientos quirúrgicos; se enfocan en la muerte celular sin tener alta especificidad, ocasionando graves efectos secundarios en los pacientes [70]. En algunos casos las células cancerosas pueden generar resistencia contra los fármacos mediante diferentes mecanismos como (i) aumento en la expresión de enzimas que actúan sobre los fármacos y los transportadores de fármacos, (ii) inhibir la interacción entre el fármaco y su objetivo, (iii) mayor capacidad para reparar el daño del DNA y (iv) defectos en la maquinaria celular que median la apoptosis [38].

En un esfuerzo por encontrar mejores terapias se han propuesto diferentes acercamientos como la terapia molecular, terapia anti-angiogénesis, inmunoterapia, regulación de la apoptosis, terapia de transducción de señales, terapia de diferenciación, terapia dirigida con radionúclidos y terapias basadas en ácidos nucleicos [71]. Hasta el momento no han logrado ser específicas, ni eficientes, además no son de fácil acceso para todos los pacientes.

Los péptidos anticancerígenos derivados de AMPs son una fuente promisoría para el diseño y desarrollo de fármacos con alto efecto citotóxico contra células cancerígenas y baja citotoxicidad frente a líneas celulares humanas normales. Dentro de estos péptidos se encuentran los derivados de LfcinB que han presentado alta actividad anticancerígena frente a diferentes líneas celulares de cáncer de mama, OSCC, leucemia, neuroblastoma y fibroblastoma, entre otros [49].

La secuencia palindrómica LfcinB (21-25)_{Pal} ha presentado alta actividad antibacteriana igual o mayor que la LfcinB. Además, péptidos diméricos, tetraméricos, cíclicos y monoméricos que contienen el motivo mínimo de actividad de la LfcinB han ejercido citotoxicidad sobre líneas derivadas de cáncer de mamá y OSCC [3]. LfcinB (21-25)_{Pal} también presentó actividad citotóxica contra líneas celulares humanas derivadas de cáncer de mama, por lo que se considera una molécula con gran potencial para diseñar y desarrollar fármacos contra este tipo de cáncer.

Pregunta de investigación

¿Cuál o cuáles de los aminoácidos de la secuencia del péptido palindrómico $^1\text{RWQWRWQWR}^9$ son relevantes en el efecto citotóxico contra líneas celulares humanas derivadas de cáncer de mama?

Objetivo general

Evaluar la actividad anticancerígena del péptido palindrómico RWQWRWQWR y de sus péptidos análogos (scan de Alaninas) frente a líneas celulares derivadas de cáncer de mama.

Objetivos específicos

-
- Evaluar el efecto citotóxico del péptido palindrómico RWQWRWQWR y de sus péptidos análogos (scan de Alaninas) frente a las líneas celulares humanas derivadas de cáncer de mama MDA-MB-468 (ATCC® HTB-132™), MDA-MB-231 (ATCC® HTB-26™) y MCF-7 (ATCC® HTB-22™).
 - Evaluar el efecto citotóxico del péptido palindrómico RWQWRWQWR y de sus péptidos análogos (scan de Alaninas) frente a cultivo primario de fibroblastos humanos normales.
 - Establecer de manera preliminar el mecanismo de acción del péptido que presentó el mayor efecto citotóxico contra las líneas celulares derivadas de cáncer de mama.
 - Caracterizar los péptidos por dicroísmo circular.

3. Métodos

Las moléculas empleadas en este estudio (Tabla 1) fueron, (i) el péptido palindrómico derivado del motivo mínimo de actividad de Lactoferricina Bovina LfcinB (21-25)_{Pal}, y (ii) sus análogos (Scan de Alaninas). Estos péptidos fueron diseñados, sintetizados y caracterizados por el grupo de investigación de Síntesis y Aplicación de Moléculas Peptídicas (SAMP; COL0115666), como parte del desarrollo del proyecto de investigación “Desarrollo de un medicamento contra el cáncer de mama basado en un péptido polivalente derivado de la LfcinB - Estudio de la fase pre-clínica (fase cero): caracterización fisicoquímica de un lote del fármaco para estudios pre-clínicos”, financiado por COLCIENCIAS, Código: 110180762973, contrato 706-2018.

Tabla 1. Péptidos derivados de LfcinB (21-25)_{Pal}

Código	Secuencia	MW (Da)
LfcinB (21-25) _{Pal}	RWQWRWQWR	1485.75
[Ala ¹] LfcinB (21-25) _{Pal}	AWQWRWQWR	1402.58
[Ala ²] LfcinB (21-25) _{Pal}	RAQWRWQWR	1371.55
[Ala ³] LfcinB (21-25) _{Pal}	RWAWRWQWR	1429.64
[Ala ⁴] LfcinB (21-25) _{Pal}	RWQARWQWR	1371.55
[Ala ⁵] LfcinB (21-25) _{Pal}	RWQWAWQWR	1401.58
[Ala ⁶] LfcinB (21-25) _{Pal}	RWQWRAQWR	1371.71
[Ala ⁷] LfcinB (21-25) _{Pal}	RWQWRWAWR	1428.73
[Ala ⁸] LfcinB (21-25) _{Pal}	RWQWRWQAR	1370.71
[Ala ⁹] LfcinB (21-25) _{Pal}	RWQWRWQWA	1400.68

3.1 Materiales y reactivos

Medio Roswell Park Memorial Institute RPMI, suero fetal bovino SFB, agua tipo II estéril, frascos de cultivo de 25 cm², frascos de cultivo de 75 cm², placas de Test 96 pozos fondo plano, placas de Test 12 pozos fondo plano, tubos eppendorf de 2,0 mL graduados, tripsina, tubos cónicos de centrífuga 15mL, tubos cónicos de centrífuga 50mL, MTT, DMSO, TRIzol, cloroformo, isopropanol, etanol, TRIS.HCl, EDTA, RNasa, enzima SuperScript III, oligodT20, tubos 0,2 mL qPCR, FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit with 7-AAD, LIVE/DEAD Viability/Cytotoxicity Kit para células mamíferas.

3.2 Cultivo celular

3.2.1 Descongelamiento

El criovial conteniendo las células, se descongeló sometiendo las células a 50°C y se mezcló con 10 mL de medio de cultivo suplementado (RPMI 10% SFB) a 37°C, posteriormente se centrifugó a 1500 rpm por 5 min, se descartó el sobrenadante, el pellet se resuspendió en 5 mL de medio de cultivo suplementado, se sembró en una caja de 25 cm² y se incubó a 37°C y 5% de CO₂. Pasadas 24 horas de incubación, el medio con debris y células no adheridas fue removido y se adicionó medio suplementado hasta que se alcanzó confluencia de 70-80%.

3.2.2 Subcultivo

Una vez las células alcanzaban 70-80% de confluencia fueron cosechadas: inicialmente se retiró el medio de cultivo sin perturbar la monocapa, luego las células fueron lavadas con PBS 1X, se les adicionó 1-2 mL de solución Tripsina-EDTA 0.25% durante 3 min a 37°C, seguido a esto las células fueron removidas y mezcladas con medio de cultivo suplementado en relación 1:5, centrifugadas a 1500 rpm por 5 min y resuspendidas en medio suplementado. Las células fueron contadas en cámara de Neubauer y subcultivadas a una relación 1:3.

3.2.3 Criopreservación

Las células fueron cosechadas a una confluencia de 70-80% y resuspendidas en SFB, luego se contaron en cámara de Neubauer y se transfirieron a crioviales a razón de 2×10^6 células/900 μ L a cada criovial se añadió 100 μ L de DMSO y se sometieron a enfriamiento en una rampa de $-1^\circ\text{C}/\text{min}$ hasta alcanzar los -80°C . Finalmente fueron almacenadas a -130°C en fase de vapor de nitrógeno líquido hasta su uso.

3.2.4 Determinación de densidad celular óptima para ensayos de toxicidad

A confluencia de 70-80% se cosecharon las células y se contaron por cámara de Neubauer, se sembraron en placa de 96 pozos por triplicado en 100 μ L partiendo de 5×10^5 células/pozo y realizando diluciones seriadas en base 2 hasta $1,56 \times 10^3$ células/pozo, se incubaron por 12 horas a 37°C y 5% CO_2 , luego se realizó el ensayo MTT para determinar la linealidad absorbancia-densidad celular. La densidad celular óptima correspondió al número de células que corresponde a la mitad de la máxima absorbancia.

3.3 Efecto citotóxico de los péptidos

3.3.1 Ensayo de viabilidad celular MTT

Células en un 70-80% de confluencia se sub-cultivaron en cajas de 96 pozos a razón de 1×10^4 células/pozo, durante 12 horas hasta su adherencia. Luego se retiró el medio y se añadieron 50 μ L del medio suplementado 10% SFB más 50 μ L del péptido reconstituido en medio sin suplementar (400, 200, 100, 50 y 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Cada péptido fue evaluado por triplicado en tiempos de 2, 24 y 48 horas de incubación. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se adicionaron 10 μ L de MTT a cada pozo y se incubó por 4 horas, posteriormente se retiró el medio y se adicionó 100 μ L de DMSO estéril y se incubó por 30 min a 37°C para solubilizar los cristales de formazan y leer absorbancia a 570nm. El blanco fue el sub-cultivo con células sin péptido y el control un sub-cultivo con un péptido de

actividad citotóxica conocida. La citotoxicidad que ejerce cada péptido sobre las células se determinó mediante la medición de la actividad metabólica celular reflejada en la conversión de la sal de tetrazolio (Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio) a cristales de formazan. Este proceso es debido principalmente a las deshidrogenasas mitocondriales, en particular la succinato deshidrogenasa, también pueden intervenir reductasas citosólicas o de otros compartimentos subcelulares, las coenzimas reducidas resultantes (NADH y NADPH) convertirán el MTT en formazan [72].

El porcentaje de viabilidad fue calculado de la siguiente manera:

$$\% \text{ de viabilidad} = \frac{ABS \text{ tratamiento} - ABS \text{ control negativo}}{ABS \text{ blanco} - ABS \text{ control negativo}} \times 100 \text{ Ec.1}$$

3.3.2 Microscopía de contraste de fases

Una vez se cultivaron las células MDA-MB-468, MDA-MB-231, MCF-7 y fibroblastos (1×10^4 células/pozo) en placas de 96 pozos y fueron tratadas con los péptidos como ha sido descrito previamente. Se tomó registro fotográfico con el microscopio Leica DMI1 al finalizar cada tiempo de tratamiento.

3.3.3 Detección lactato deshidrogenasa

En placas de 6 pozos se sub-cultivaron las células MCF-7 a 60% de confluencia a razón de 1×10^6 células/pozo, durante 12 horas hasta su adherencia; posteriormente se retiró el medio y se añadieron 500 μ L del medio suplementado 10% SFB más 500 μ L del péptido reconstituido en medio sin suplementar a una concentración final de 200 μ g/mL incubado por 2 y 24 horas; teniendo como blanco el sub-cultivo con células sin péptido y como control de apoptosis células tratadas con doxorrubicina 10 nM. En placas de 96 pozos, se tomó 1 μ L de sobrenadante de cada tratamiento y 49 μ L del buffer de ensayo proveído por el kit comercial Lactate Dehydrogenase Activity Assay KitTM Sigma-Aldrich®, se adicionaron 50 μ L de la “reacción maestra” a cada pozo y se leyó absorbancia inicial a 450 nm, se incubó a 37°C en oscuridad tomando medidas de absorbancia cada 5 min hasta que la absorbancia

de alguna muestra superará la del estándar. Se calculó la actividad enzimática con la siguiente ecuación:

$$\frac{B}{(\text{Tiempo de reacción})(V)} \times \text{Factor de dilución} = \text{miliunidades/mL} \text{ Ec.2}$$

B = nmoles de NADH generados entre T_{inicial} y T_{final}

Tiempo de reacción = T_{final} - T_{inicial} (min)

V = volumen de muestra añadido al pozo (mL)

Miliunidades/mL = nmol/min/mL (cantidad de enzima que cataliza la conversión de lactato a piruvato generando 1 µmol de NADH por minuto a 37°C).

3.4 Citometría de flujo

3.4.1 Ensayo Apoptosis/Necrosis

Las células MCF-7 fueron cultivadas en placa de 24 pozos a 60% de confluencia a una densidad de 4x10⁴ células/pozo por 12 horas hasta su adherencia, luego se retiró el medio y se añadieron 200 µL del medio suplementado 10% SFB más 200 µL del péptido LfcinB (21-25)_{pal} reconstituido en medio sin suplementar a concentración final de 200 µg/mL a 2 y 24 horas de incubación. Pasado el tiempo de tratamiento la placa se centrifugó a 2000 rpm por 5 min, luego se lavaron las células con PBS 1X y se cosecharon con 80 µL de Tripsina-EDTA 0.25%, posteriormente fueron transferidas a tubos cónicos de centrífuga de 2 mL y se centrifugaron a 10000 rpm por 5 min, se descartó el sobrenadante y se resuspendió en 400 µL de solución de buffer de tinción con los fluorocromos (Buffer de unión a Anexina-V 1X, 0,5 µL de FITC Anexina V y 0.5 µL de 7-AAD por cada 5x10⁶ células). Las células con los fluorocromos fueron incubadas en oscuridad por 15 min a 25°C, luego se centrifugaron a 10000 rpm por 10 min, se resuspendieron en 200 µL de PBS-EDTA 1 mM y se analizaron mediante citometría de flujo. Como control de apoptosis las células se trataron con doxorubicina 10 nM por 24 horas, de necrosis se trataron con doxorubicina 25 nM por 24 horas y como control negativo células sin tratamiento [73].

3.4.2 Evaluación de membrana citoplasmática

Las células MCF-7 fueron sembradas en cajas de 24 pozos a razón de 4×10^4 células/pozo, una vez adheridas se reemplazó el medio de cultivo con 200 μ L del medio suplementado 10% SFB más 200 μ L del péptido LfcinB (21-25)_{Pal} reconstituido en medio sin suplementar para una concentración final de 200 μ g/mL, luego de 2 horas de tratamiento las células fueron cosechadas con tripsina y centrifugadas a 2500 rpm por 5 min, lavadas con PBS y posteriormente teñidas con 30 μ L de la mezcla fluorocromos SYTO9 0,5 μ L y Ioduro de Propidio (IP) 0,5 μ L en 99 μ L de PBS del kit comercial LIVE/DEAD® FungaLight™. Seguido, las células fueron incubadas por 20 min, centrifugadas y resuspendidas en 100 μ L de PBS. Se realizó análisis de citometría en el equipo BD Accuri C6™. Control negativo: células no tratadas marcadas, control positivo: células tratadas con actinomicina 10 μ g/mL por 24 horas [60].

3.4.3 Determinación despolarización de membrana mitocondrial

Las células MCF-7 fueron sembradas en cajas de 24 pozos a razón de 4×10^4 células/pozo, una vez adheridas se reemplazó el medio de cultivo con 200 μ L del medio suplementado 10% SFB más 200 μ L del péptido LfcinB (21-25)_{Pal} reconstituido en medio sin suplementar para una concentración final de 200 μ g/mL, luego de 2 horas de tratamiento las células fueron cosechadas con tripsina y centrifugadas a 2500 rpm por 5 min, lavadas con PBS y posteriormente teñidas con 100 μ L de la solución de trabajo del kit comercial MitoProbe™ JC-1 (solución 1:100 de JC1 reconstituido en DMSO: Buffer assay 1X) por 20 min a 37°C. Las células fueron lavadas dos veces con el buffer de ensayo proveído en el kit y resuspendidas en 100 μ L de este para su lectura en el citómetro BD Accuri C6™. Control negativo: células no tratadas marcadas, control positivo: células tratadas con actinomicina 10 μ g/mL por 24 horas [60].

3.5 Determinación de la expresión de los genes que codifican las proteínas pro y anti-apoptóticas

3.5.1 Extracción RNA con TRIzol®

En placas de 6 pozos se sub-cultivaron las células a 60% de confluencia a razón de 1×10^6 células/pozo, durante 12 horas hasta su adherencia; posteriormente se retiró el medio y se añadieron 500 μ L del medio suplementado 10% SFB más 500 μ L del péptido reconstituido en medio sin suplementar a una concentración final de 200 μ g/mL incubado por 2 y 24 horas; teniendo como blanco el sub-cultivo con células sin péptido y como control de apoptosis células tratadas con doxorrubicina 10 nM.

Una vez transcurrido el tiempo de tratamiento se centrifugó la placa a 2500 rpm por 5 min, se retiró el medio y se adicionó TRIzol® (600 μ L/pozo), en baño de hielo. La extracción se realizó pipeteando repetidas veces hasta homogenizar la mezcla, rompiendo células y componentes celulares y permitiendo la extracción de RNA, DNA y proteínas. Después se agregaron 120 μ L de cloroformo, se incubó durante 5 min y se centrifugó a 12.000 g x 15 min a 4°C. A la fase acuosa que contiene el RNA se le agregaron 300 μ L isopropanol y se incubó a TA durante 10 min, luego se centrifugó a 12.000 g x 10 min a 4°C. El precipitado (RNA) se resuspendió en 600 μ L de etanol al 75% y se centrifugó a 7.500 g por 5 min a 4°C. El pellet se reconstituyó en 20 μ L de agua tipo II, se incubó por 10 min a 55°C y se almacenó a -70°C [74].

3.5.2 Retrotranscripción

La retrotranscripción se efectuó mediante la enzima SuperScript IV (Invitrogen Corp. Carlsbad, CA), para ello se preparó cada muestra con el volumen equivalente a 1 μ g de RNA, 1 μ L de mix de dNTPs, 1 μ L de random primers y se llevó a un volumen final de 13 μ L con H₂O DEPC. Sobre esta se añadió un mix de reacción con 4 μ L de buffer de reacción, 1 μ L de DTT, μ L de RNAsa OUT y 1 μ L de SuperScript IV. El protocolo de retrotranscripción

consistió en 5 min a 65°C, 3 min a 0°C, 5 min a 25°C, 10 min a 50°C, 10 min a 80°C y 5 min a 0°C.

3.5.3 PCR en tiempo real

En la PCR en tiempo real, la amplificación y detección ocurren de manera simultánea. La detección se realiza por la conjugación de una sonda fluorescente al DNA sintetizado durante la amplificación, cada muestra se realizó por duplicado utilizando *18s* como gen de referencia para la normalización de las muestras, y 5 genes relacionados con eventos pro y anti-apoptóticos. Los reactivos a utilizar son SYBR Premix Ex Taq: en las siguientes proporciones: 1 µL de cDNA 1:10 dilución, 1,5 µL de SYBR Premix Ex Taq2x, 0,075 µL de cada primer 10 µM (Tabla 2.) y 3,5 µL de agua.

Tabla 2. Primers empleados en la amplificación de genes pro y anti apoptóticos

Gen	Secuencia primers	MW (g/mol)	Tm
<i>18s</i>	F: GCGTGACATTAAGGAGAAG	5926	56
	R: GAAGGAAGGCTGGAAGAG	5687	
<i>Bax</i>	F: AGCAGATCATGAAGACAGGGG	6554	62
	R: TGCTCGATCCTGGATGAAACC	6407	65
<i>Casp-3</i>	F: TTTTTCAGAGGGGATCGTTG	6195	60
	R: GGCAGGCCTGAATAATGAAA	6200	60
<i>APAF-1</i>	F: TTCTGATGCTTCGCAAACAC	6053	60
	R: CACCCAAGAGTCCCAAACAT	6025	60
<i>Bid</i>	F: TGGCCTTCATATCATCCACA	6013	60
	R: GGAACCTGCACAGTGGAAT	6176	60
<i>Survivina</i>	F: TGAGAACGAGCCAGACTTGG	6192	62
	R: GTTCCTCTATGGGGTCGTCA	6116	60
<i>SMAC</i>	F: GAAGCTGGAAACCACTTGGATGA	7200	61
	R: TGAATGTGATTCCTGGCGGTTA	6875	60

4. Resultados y Discusión

Para el desarrollo de este trabajo se evaluó el efecto citotóxico de 11 péptidos derivados del motivo mínimo de actividad de la Lactoferricina Bovina; el péptido LfcinB (21-25)_{Pal} de secuencia palindrómica y péptidos análogos a este (Scan de Alaninas) (Tabla 1) frente a tres líneas celulares derivadas de cáncer MDA-MB-468, MDA-MB-231 y MCF-7, y un cultivo primario de fibroblastos humanos normales, donde se determinaron los aminoácidos críticos en su actividad y realizando análisis SAR apoyados en el estudio de su estructura secundaria; seguido se realizó el estudio preliminar del mecanismo de acción del péptido que presentó mayor actividad citotóxica. A continuación, se discutirán los resultados obtenidos.

4.1 Caracterización de los péptidos

El péptido LfcinB (21-25)_{Pal} se diseñó a partir del motivo mínimo de lactoferricina bovina RRWQWR, en el cual la secuencia WQW flanqueada por R se presenta en un arreglo palindrómico; se ha propuesto que su actividad biológica radica en sus 4 cargas y conformación anfipática, lo que permitiría la interacción de residuos básicos e hidrofóbicos (Tabla 3) [3] [76]. Las propiedades fisicoquímicas de los péptidos análogos muestran diferencias tanto en carga como en hidrofobicidad y anfipaticidad demostrando que el reemplazo de cualquiera de los residuos Arg, Gln o Trp por Ala tiene efecto directo sobre estos parámetros. En la Tabla 3 se observa la carga neta a pH=7, el promedio de hidropatía (GRAVY) y la longitud promedio del momento hidrofóbico.

Aquellos péptidos donde se modificó la Arg [^{1,5,9}Ala] LfcinB (21-25)_{Pal} presentan una carga menos debido a que se reemplazó con un residuo no polar sin carga, además se observó una disminución en la longitud promedio del momento hidrofóbico cuando se modifican los residuos de la posición 1 y 5 lo que genera una disminución en la anfipaticidad y por lo tanto una menor capacidad de interactuar de forma hidrofóbica con las membranas.

Tabla 3. Propiedades fisicoquímicas de los péptidos evaluados

Código	Carga Nata	GRAVY	Longitud promedio del vector de momento hidrofóbico (kTÅ/e)
LfcinB (21-25) _{Pal}	+4	-2.68	31.35
[Ala ¹] LfcinB (21-25) _{Pal}	+3	-1.98	20.15
[Ala ²] LfcinB (21-25) _{Pal}	+4	-2.38	33.42
[Ala ³] LfcinB (21-25) _{Pal}	+4	-2.09	33.07
[Ala ⁴] LfcinB (21-25) _{Pal}	+4	-2.38	31.82
[Ala ⁵] LfcinB (21-25) _{Pal}	+3	-1.98	24.99
[Ala ⁶] LfcinB (21-25) _{Pal}	+4	-2.38	30.82
[Ala ⁷] LfcinB (21-25) _{Pal}	+4	-2.09	31.33
[Ala ⁸] LfcinB (21-25) _{Pal}	+4	-2.38	29.33
[Ala ⁹] LfcinB (21-25) _{Pal}	+3	-1.98	32.73

En los demás casos las modificaciones generaron un aumento en la longitud del vector HM lo que daría una distribución desbalanceada de las áreas superficiales polares y no polares con una estructura más extendida y, por tanto, disminución en su actividad [77]. Al presentar todos los péptidos un índice GRAVY con valores negativos se pudo determinar que son hidrofílicos, observando que los péptidos análogos presentan una carga hidrofóbica mayor que LfcinB (21-25)_{Pal}. Esta hidrofobicidad fue mayor en [^{1,5,9}Ala] LfcinB (21-25)_{Pal}, seguido los péptidos donde se modificó la Gln y finalmente aquellos en los que se reemplazó Trp, en los que se observó una menor hidrofobicidad respecto a los cambios

de Arg evidenciando que la pérdida de un residuo cargado localizado en la superficie genera una disminución en su solubilidad en agua [78].

El péptido LfcinB (21-25)_{pal} evidenció características anfifílicas en la proyección de rueda helicoidal (Fig. 4) con una cara cargada con residuos de Arg, una cara opuesta llevando residuos de Gln, mientras que en las caras flanqueantes están ubicados los residuos hidrofóbicos de Trp; de igual forma, se mantuvo esta conformación en todos los péptidos análogos donde se observó que la modificación por Ala no generó pérdida total de las caras hidrofóbicas e hidrofílicas, manteniendo así las características anfipáticas del péptido del cual fueron derivados.

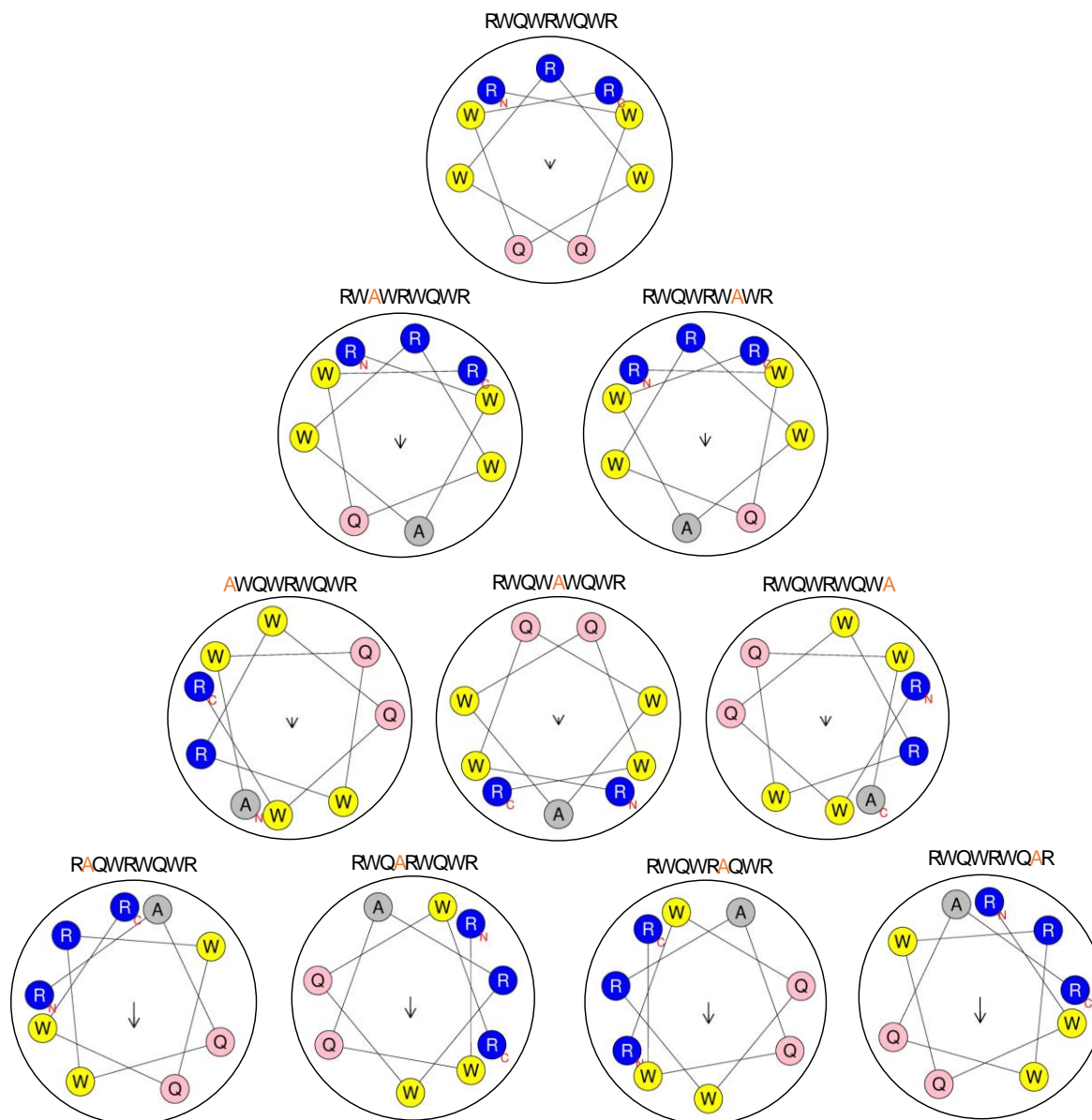


Figura 4. Proyecciones de rueda helicoidal de los péptidos evaluados en este estudio.

Para caracterizar la estructura secundaria tanto del péptido palindrómico como de sus análogos [¹⁻⁹Ala] LfcinB (21-25)_{Pal}, se analizaron por dicroísmo circular (DC) a condiciones similares a la de membrana. Como se muestra en la figura 5, LfcinB (21-25)_{Pal} adoptó estructura random coil predominante a 30% de TFE exhibiendo un mínimo entre 200-202 nm y máximo entre 225-227 nm. Este espectro difiere del obtenido previamente para el motivo mínimo LfcinB (21-25)_{Pal} el cual presenta una estructura random coil con un mínimo

a 206 nm, lo que sugiere que el diseño de esta secuencia palindrómica afecta algunos elementos de la estructura secundaria del péptido [3].

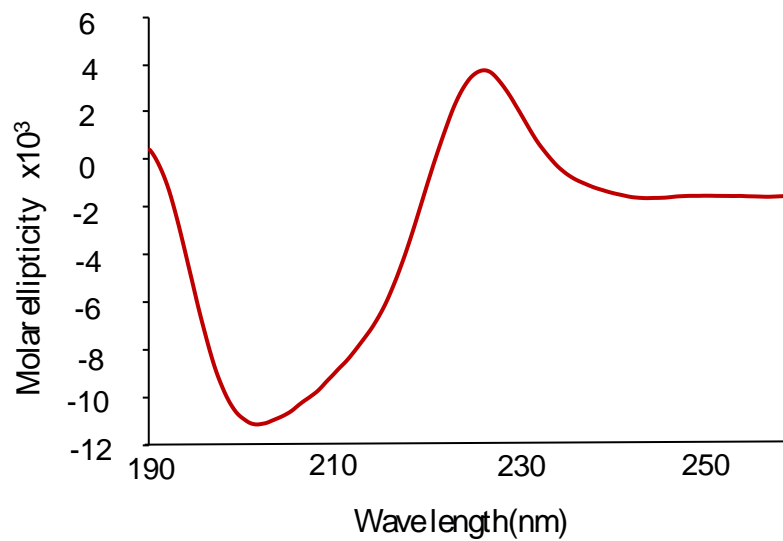


Figura 5. Espectro de dicroísmo circular (CD) del péptido sintético LfcinB (21-25)_{Pal} en TFE 30%.

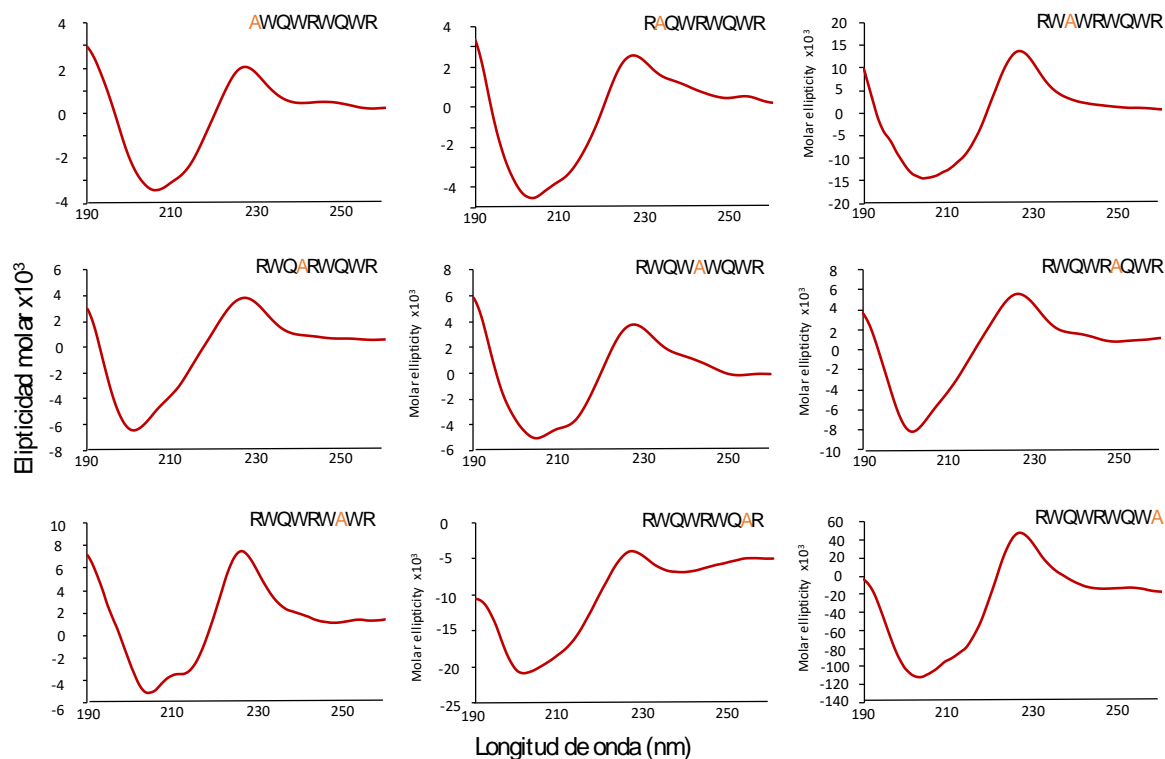


Figura 6. Espectro de dicroísmo circular (CD) de los péptidos análogos generados por Scan de Alaninas del péptido LfcinB (21-25)_{Pal}

Para los péptidos análogos se obtuvieron espectros de CD similares al del palíndromo donde todos exhibieron estructura random coil con una elipticidad molar mínima y máxima dentro de los mismos rangos que para el espectro de LfcinB (21-25)_{Pal}, esto nos sugiere que el reemplazo de uno de los residuos de la secuencia, independientemente de cuál sea, por Alanina no afecta de forma significativa los elementos de estructura secundaria.

4.2 Efecto citotóxico de LfcinB (21-25)_{Pal} y análogos

4.2.1 Determinación de densidad celular óptima para ensayos de toxicidad

Se realizaron curvas de calibración (N° de células vs absorbancia) para cada una de las líneas celulares y el cultivo primario; los resultados obtenidos evidenciaron que hay una relación lineal entre la absorbancia determinada por MTT y la densidad celular de todos los modelos evaluados, desde $1,56 \times 10^3$ hasta $2,5 \times 10^5$ células/pozo (Anexo 1), se determinó

la ecuación de la recta y el coeficiente de determinación por ajuste de mínimos cuadrados. La densidad celular óptima para los ensayos de MMT se determinó a confluencia de 60% y absorbancias cercanas a 0,7 lo cual permitiría que cuando se alcanzara el tiempo de duplicación el número de células se mantuviera dentro de la linealidad de la curva.

Tabla 4. Resultados de las curvas de calibración obtenidas con cada modelo celular.

Modelo celular	Tiempo duplicación (h)	Ecuación de la recta	R ²	10 ⁴ células por pozo / absorbancia
MDA-MB-468	47	$y = 3.425E^{-5}x + 0.3277$	0.9863	1.0 / 0.670
MDA-MB-231	36	$y = 4.166E^{-5}x + 0.2871$	0.9830	1.0 / 0.703
MCF-7	38	$y = 3.001E^{-5}x + 0.0710$	0.9952	2.0 / 0.671
Fibroblastos	32	$y = 2.552E^{-5}x + 0.2722$	0.9769	1.5 / 0.655

4.2.2 Efecto citotóxico de los péptidos

4.2.2.1 Viabilidad celular en líneas celulares derivadas de cáncer de mama

Se determinó el efecto citotóxico de los péptidos, a diferentes concentraciones (200, 100, 50, 25 y 12,5 µg/mL), sobre las líneas celulares MDA-MB-468, MDA-MB-231 y MCF-7. Cada péptido fue evaluado por triplicado en tiempos de 2, 24 y 48 horas. Los resultados demuestran que el efecto de los péptidos sobre las líneas celulares evaluadas no fue diferencial en los tiempos evaluados (Anexos 2-11) lo cual nos permite determinar que la acción de los péptidos es rápida y se mantiene en el tiempo bajo una sola dosis administrada. Este efecto de rápida acción ya se había reportado para el péptido palindrómico frente a líneas celulares derivadas de cáncer oral escamoso Cal-27 y SCC-15 cuya actividad fue testeada de 1 a 24 horas observando un patrón similar de efecto rápido y sostenido en el tiempo [52]; además, otros péptidos derivados de este motivo mínimo como el péptido tetramérico LfcinB (20-25)₄ ejerció efecto sobre la línea MDA-MB-468

desde las 0.5 horas [60], también péptidos derivados de LFB (14-31) presentaron citotoxicidad frente a células cancerosas MethA, MT-1 y A549 a 4 horas de incubación [79].

El péptido palindrómico LfcinB (21-25)_{Pal} presentó los mayores efectos citotóxicos en las líneas evaluadas exhibiendo viabilidades celulares menores al 50% a la máxima concentración evaluada; la línea celular MDA-MB-468 fue la más sensible al efecto del péptido palindrómico, con viabilidad celular del 27% a la máxima concentración evaluada (Fig. 7). Es interesante observar que el motivo mínimo de actividad LfcinB (20-25): RRWQWR no presenta disminución en la viabilidad de las células MDA-MB-468 y MDA-MB231 bajo las mismas condiciones evaluadas en este ensayo [53], de igual forma se reportó que frente a las células derivadas de leucemia Jurkat y CCRF-CEM este péptido no ejerció efecto citotóxico [48]. Estos resultados nos permiten corroborar el postulado de que secuencias palindrómicas derivadas de una secuencia activa original presentan mayor actividad biológica [57].

Además, se evidenciaron cambios morfológicos en las líneas celulares evaluadas tratadas con el péptido palindrómico, adquiriendo formas redondeadas, disminución de tamaño y contracción en algunas de las células (Fig. 7), siendo más evidente en la línea MDA-MD-468 como era de esperarse; cambios similares se han reportado en células MCF-7 tratadas con el péptido tetramérico LfcinB (20-25)₄ que también contiene el motivo mínimo de LfcinB [54].

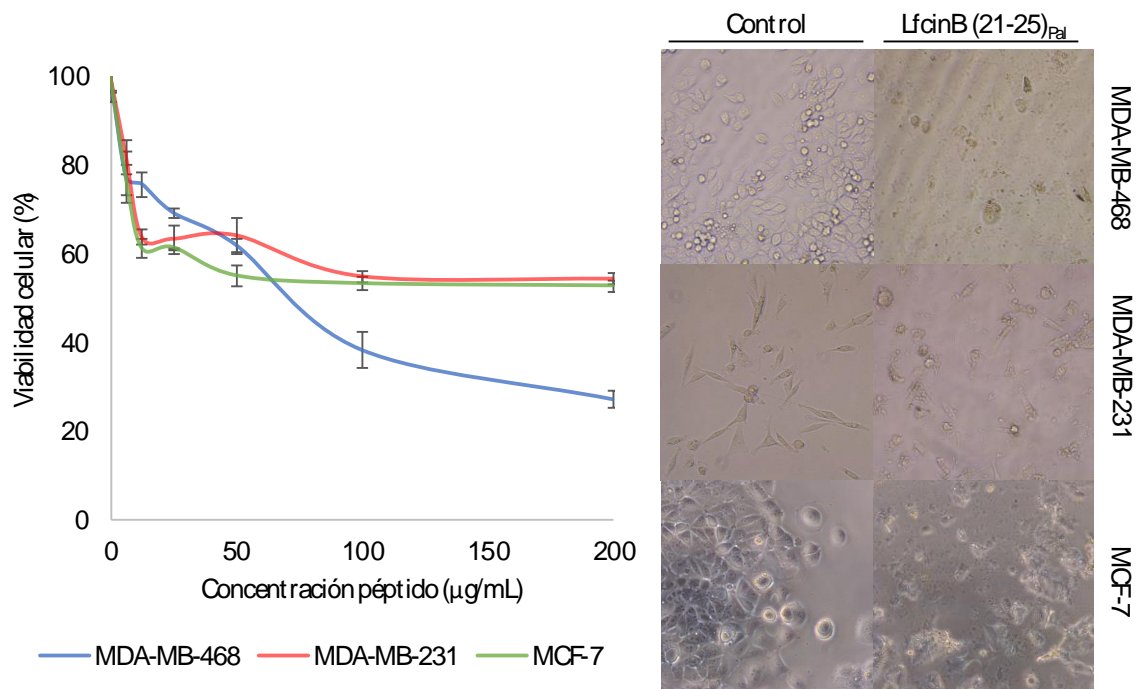


Figura 7. Efecto citotóxico del péptido LfcinB (21-25)_{Pal} a 24 horas de incubación sobre la viabilidad celular de las líneas celulares MDA-MB-468, MDA-MB-231 y MCF7. S.E \pm n=3. Cambios morfológicos registrados con microscopía de contraste bajo iguales condiciones de ensayo a 20x.

Los péptidos análogos al palíndromo, [¹⁻⁹Ala] LfcinB (21-25)_{Pal}, presentaron efecto citotóxico disminuido con respecto al péptido original en las líneas celulares evaluadas. La línea MDA-MB-468 fue la más sensible al tratamiento con los análogos (Fig. 8), igual a lo observado para el péptido original, LfcinB (21-25)_{Pal}. Los péptidos con sustituciones de Arginina por Alanina [^{1,5,9}Ala] LfcinB (21-25)_{Pal} presentaron menor efecto citotóxico sobre las líneas celulares evaluadas (Fig. 5), siendo para MDA-MB-468 el péptido [⁵Ala] LfcinB (21-25)_{Pal} el que presentó menor efecto citotóxico y el péptido [⁹Ala] LfcinB (21-25)_{Pal} presentó menor efecto citotóxico contra la línea celular MCF-7. Además, se observaron células con formas redondeadas y aglomeraciones en el medio celular (Fig. 9).

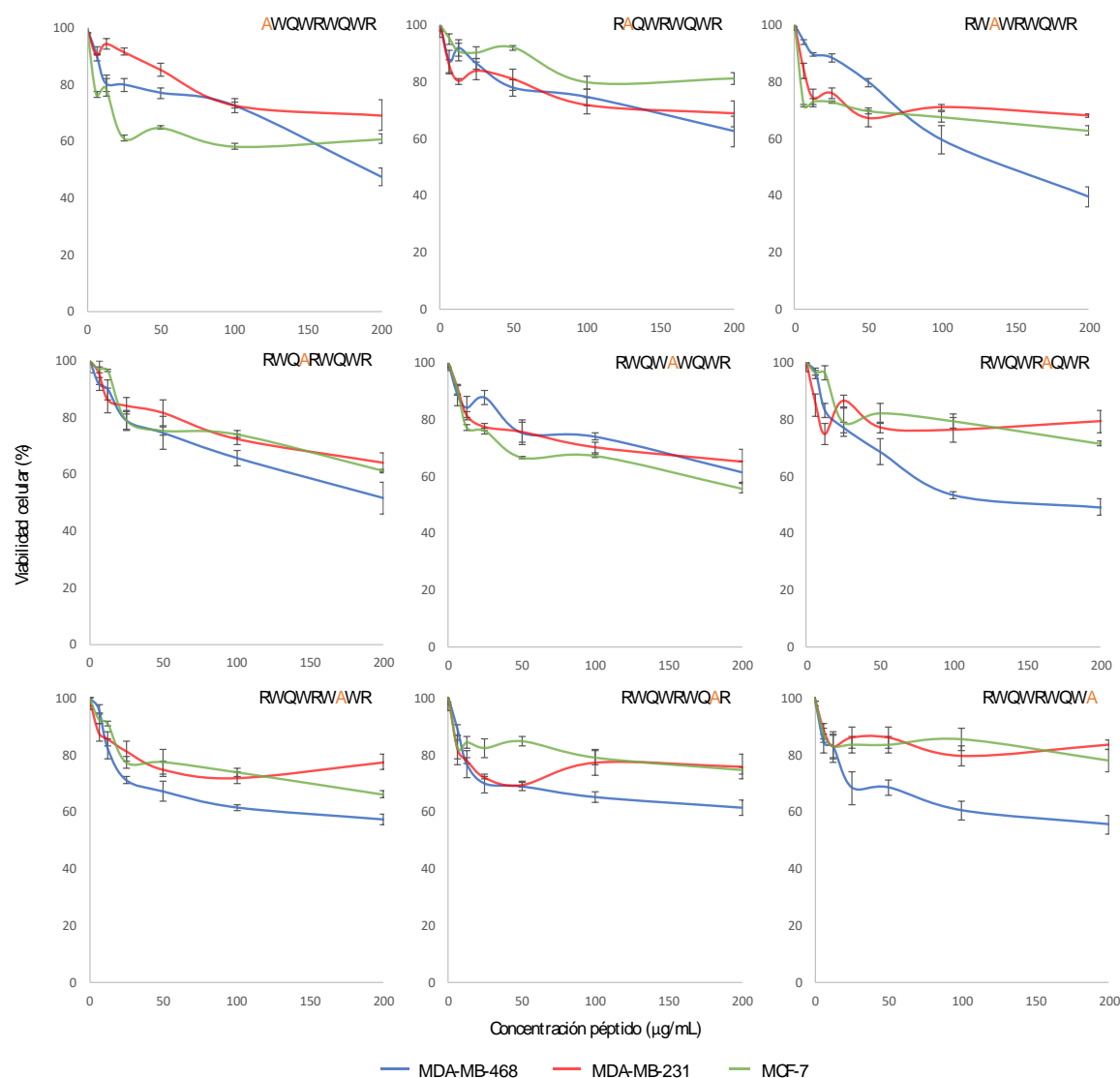


Figura 8. Efecto de los péptidos análogos sobre la viabilidad celular de las líneas celulares MDA-MB-468, MDA-MB-231 y MCF7 a 24 horas de incubación. S.E \pm n=3

Cuando las células fueron tratadas con los péptidos con cambio de Triptófano por Alanina [^{2,4,6,8}Ala] LfcinB (21-25)_{Pal} se evidenció disminución del efecto citotóxico y no se observaron cambios morfológicos en las células (Fig. 8). En estos péptidos donde se reemplazó la Arginina o el Triptófano por Alanina fueron en los que se generó mayor disminución del efecto citotóxico, lo cual puede estar relacionado con el hecho que la ausencia de un residuo básico o uno hidrofóbico afecta la anfipaticidad de la secuencia, la cual se ha sugerido es una característica determinante para la actividad anticancerígena de los AMPS [79]. De igual forma, se ha reportado que péptidos derivados de LfcinB con

modificaciones en estos residuos del motivo mínimo pierden su actividad, por lo que se han considerado como críticos para el efecto citotóxico [80].

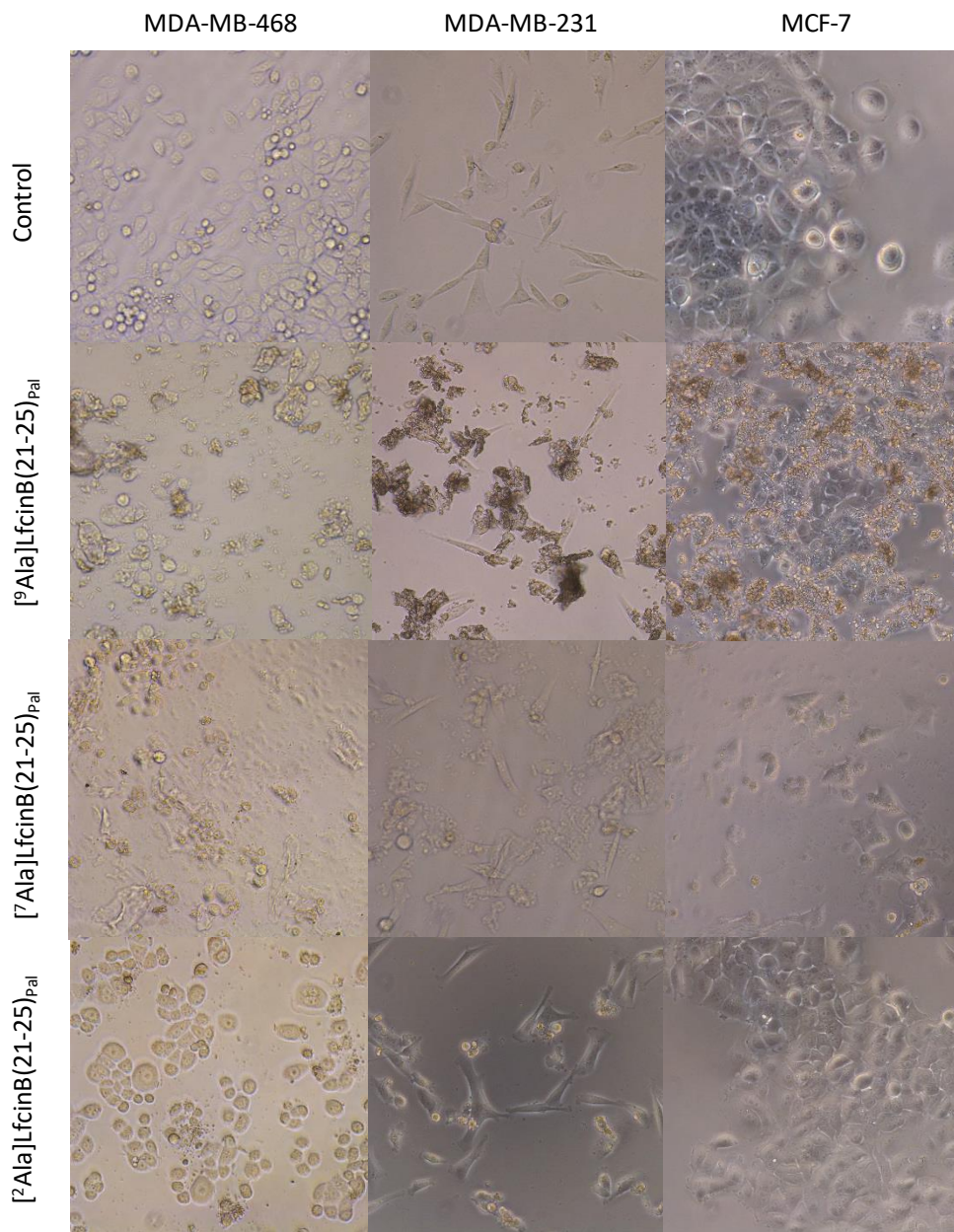


Figura 9. Microfotografías representativas de las líneas celulares derivadas de cáncer de mama sin tratamiento (control), y tratadas con: (i) [9Ala] LfcinB (21-25)Pal (cambio de Arg por Ala); (ii) [7Ala] LfcinB (21-25)Pal (cambio de Gln por Ala) y [2Ala] LfcinB (21-25)Pal (cambio de Trp por Ala). Los péptidos fueron usados a 200 µg/mL y 24 horas de incubación.

Las células tratadas con péptidos cuyos residuos de Triptófano se reemplazaron por Alanina, además de generar una baja citotoxicidad no indujeron cambios morfológicos, lo cual podría deberse a que estos residuos generan la ruptura o formación de poros en la membrana para su internalización hacia blancos intracelulares [81] [82], efectos similares se han observado en péptidos cortos lineales derivados de LfcinB donde la modificación de este residuo desencadena una pérdida severa de la actividad anticancerígena [79].

El efecto ejercido por los péptidos análogos donde se cambió la Glutamina por Alanina se observó que el péptido [³Ala] LfcinB (21-25)_{Pal} no generó un efecto citotóxico significativamente diferencial a través del tiempo, mientras que cuando se reemplaza la Q⁷ ([⁷Ala] LfcinB (21-25)_{Pal}) el efecto citotóxico es diferencial a las 48 horas generando una disminución del 22% en la viabilidad de las células (Fig. 8); en ambos casos no se evidenciaron cambios morfológicos (Fig. 9).

Los resultados obtenidos evidencian que, el efecto citotóxico de la secuencia palindrómica LfcinB(21-25)_{Pal} puede ser afectado por cambios en la estructura primaria corroborando así la importancia del contenido de Arg y Trp en péptidos anticancerígenos cortos similares al nuestro [49], lo que sugiere que la anfipaticidad de este péptido es una propiedad relevante en su efecto citotóxico contra líneas celulares humanas derivadas de cáncer de mama.

4.2.2.2 Viabilidad celular en cultivo primario de fibroblastos humanos normales

El efecto del péptido palindrómico fue evaluado frente a un cultivo primario de fibroblastos humanos normales bajo las mismas condiciones mencionadas previamente, se observó que el péptido LfcinB (21-25)_{Pal} no ejerció un efecto citotóxico significativo sobre las células a ninguna de las concentraciones o tiempos evaluados, además no se observaron cambios morfológicos (Fig. 10). Para este péptido se observó que no hay una disminución significativa en la viabilidad celular de los fibroblastos (<8%), lo cual nos permite inferir que este LfcinB (21-25)_{Pal} ejerce citotoxicidad selectiva contra líneas celulares cancerosas.

Dicha selectividad también había sido reportada previamente para el péptido tetramérico LfcinB (20–25)₄, que contiene el motivo RRWQWR el cual no presentó efecto citotóxico frente a la línea inmortalizada de trofoblasto CRL-3271 [54]; de igual forma, para otros péptidos cortos derivados de LfcinB con secuencia palindrómica no se observó efecto citotóxico sobre células HEK-293 [57].

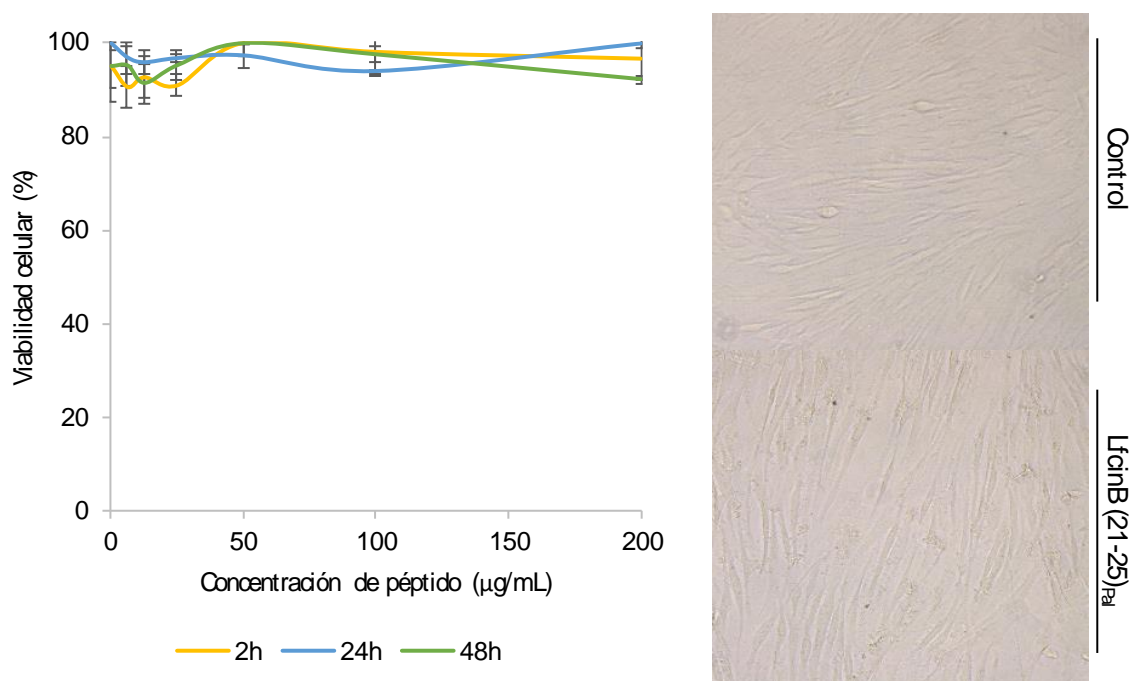


Figura 10. Efecto citotóxico del péptido LfcinB (21-25)_{Pal} a 2, 24 y 48 horas de incubación sobre la viabilidad celular de un cultivo primario de fibroblastos humanos. S.E \pm n=3. Cambios morfológicos registrados con microscopía de contraste bajo iguales condiciones de ensayo a 20x.

En los péptidos donde se cambió el residuo de Arginina por Alanina, aunque se observó una modificación en el medio de cultivo, no se evidenciaron cambios morfológicos (Fig. 12). Los cambios de las Argininas de los extremos N y C-terminal no generaron un efecto citotóxico relevante a las condiciones evaluadas, sin embargo, el reemplazo de la R⁵ ejerció una citotoxicidad dependiente de la concentración y tiempo reduciendo la viabilidad celular en un 19% a 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (Fig. 11).

Péptidos donde se reemplazó el Triptófano por Alanina no ejercieron cambios morfológicos aparentes (Fig. 12), pero se evidenció un efecto citotóxico dependiente del

tiempo en todos los casos (Fig. 11), siendo el péptido [⁴Ala] LfcinB (21-25)_{Pal} a 48 horas y 200 µg mL⁻¹ el que generó una mayor reducción en la viabilidad celular del 35%, mientras que los otros péptidos con dicha modificación disminuyeron la viabilidad celular en un 15-20% bajo las mismas condiciones.

El efecto ejercido por los péptidos donde se cambió la Glutamina por Alanina se observó que el péptido [³Ala] LfcinB (21-25)_{Pal} no generó un efecto citotóxico significativamente diferencial a través del tiempo, mientras que cuando se reemplaza la Q⁷ ([⁷Ala] LfcinB (21-25)_{Pal}) el efecto citotóxico es diferencial a las 48 horas generando una disminución del 22% en la viabilidad de las células; en ambos casos no se evidenciaron cambios morfológicos (Fig. 12).

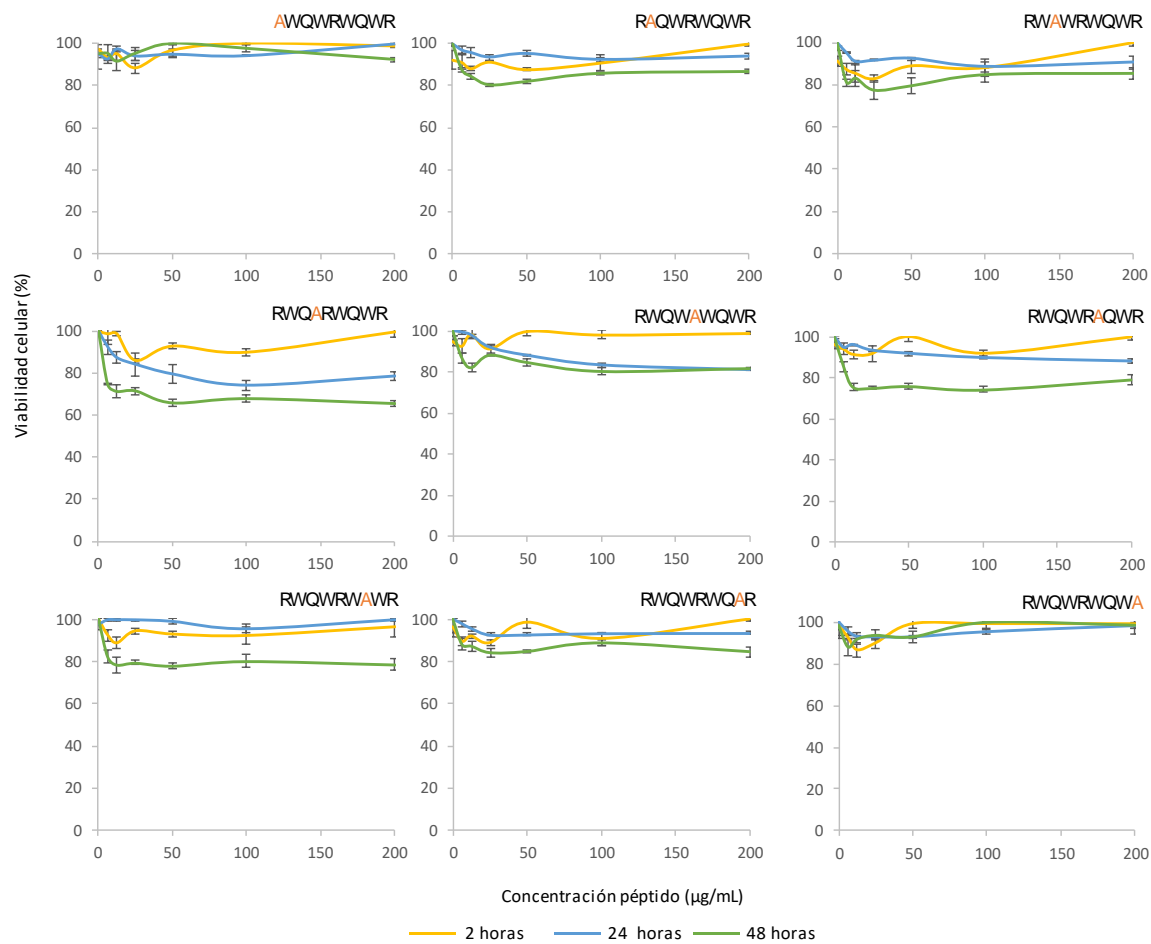


Figura 11. Efecto de los péptidos análogos sobre la viabilidad de cultivo primario de fibroblastos humanos a 2, 24 y 48 horas de incubación. S.E \pm n=3

Contrario a lo evidenciado para líneas celulares cancerosas, los péptidos análogos generaron reducción significativa de la viabilidad celular del cultivo primario de fibroblastos comparado con la ausencia de efecto citotóxico del péptido palindrómico. La citotoxicidad ejercida por los análogos a excepción de $[^{1,9}\text{Ala}]\text{-LfcinB (21-25)}_{\text{Pal}}$, fue significativamente diferencial en el tiempo; esto concuerda con reportes previos donde se había descrito que pequeños cambios en la secuencia peptídica tenían una influencia significativa en la disminución de la selectividad del efecto citotóxico frente a líneas celulares cancerosas [79].

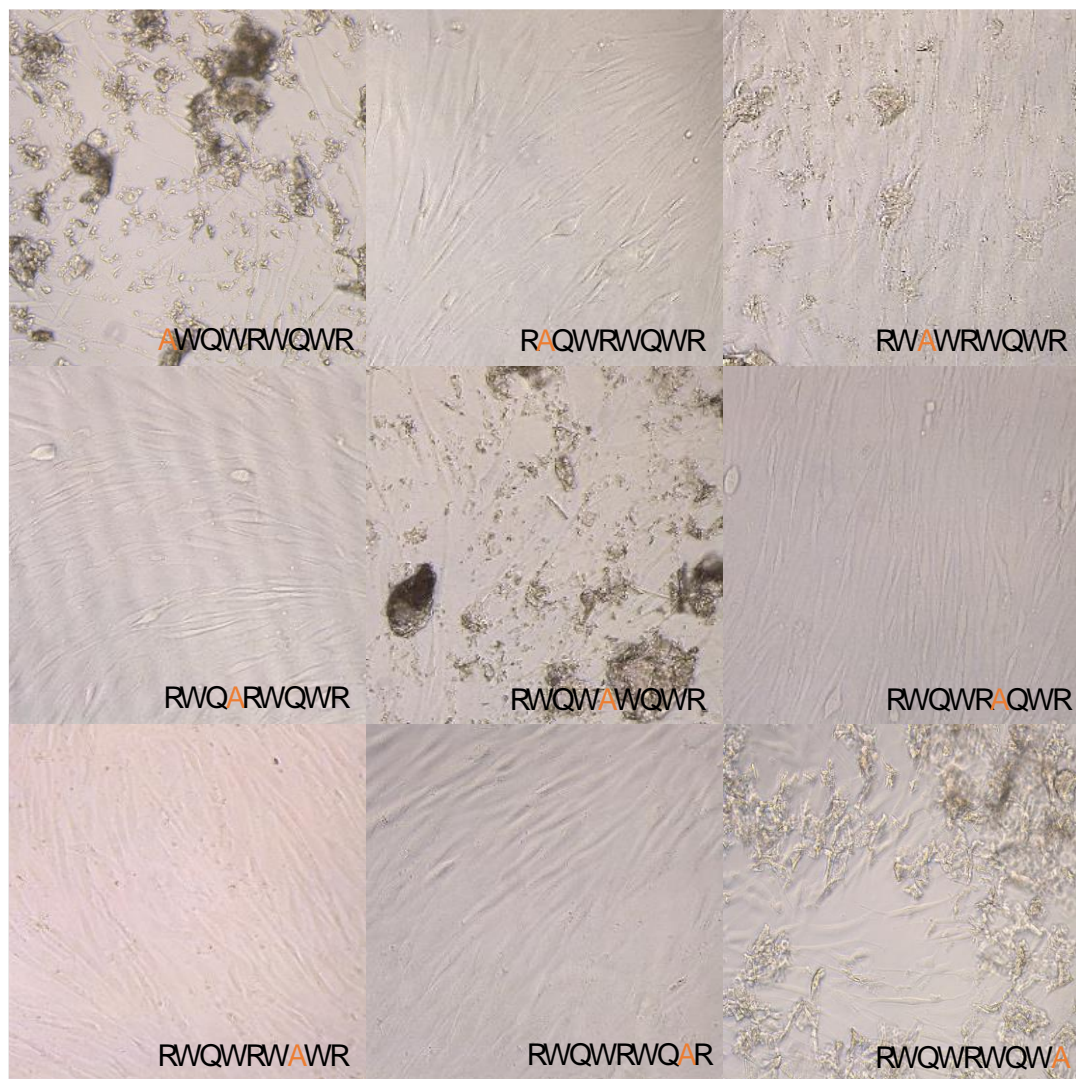


Figura 12. Microfotografías del cultivo primario de fibroblastos tratado con los péptidos análogos $200 \mu\text{g mL}^{-1}$ y 24 horas de incubación. Se observan características morfológicas de las células.

4.3 Detección Lactato Deshidrogenasa

Como se evidenció previamente el péptido LfcinB (21-25)_{Pal} presentó la mejor actividad citotóxica, por lo que se evaluó la afectación a la membrana celular mediante la actividad de Lactato Deshidrogenasa (LDH) en los medios sobrenadantes de células MCF-7 y fibroblastos tratados con el péptido para corroborar la citotoxicidad selectiva del péptido y su efecto sobre la membrana. Para ello se realizó la curva de calibración con un estándar de NADH (Anexo 12) y se evaluó la reducción de NAD⁺ a NADH por la enzima LDH por colorimetría a 450 nm a 2 horas de incubación.

Se observó que el péptido palindrómico no genera afectación de la membrana de los fibroblastos ya que no se observa actividad de LDH en el medio de cultivo (Fig. 12); de igual forma se observa que las células MCF-7 tratadas con el péptido a concentraciones de 50 y 100 µg/mL no generaron exclusión de LDH por lo tanto se podría sugerir que bajo estos tratamientos no se genera afectación rápida a la membrana celular, contrario a esto, el tratamiento de las células con el péptido a 200 µg/mL generó reducción significativa de NAD la cual es diferencial con el control, lo que sugiere pérdida rápida de la integridad de la membrana. Previamente se ha evidenciado que a esta concentración el péptido palindrómico causa un leve efecto disruptivo sobre la membrana de células derivadas de OSCC a 1 hora de tratamiento [49].

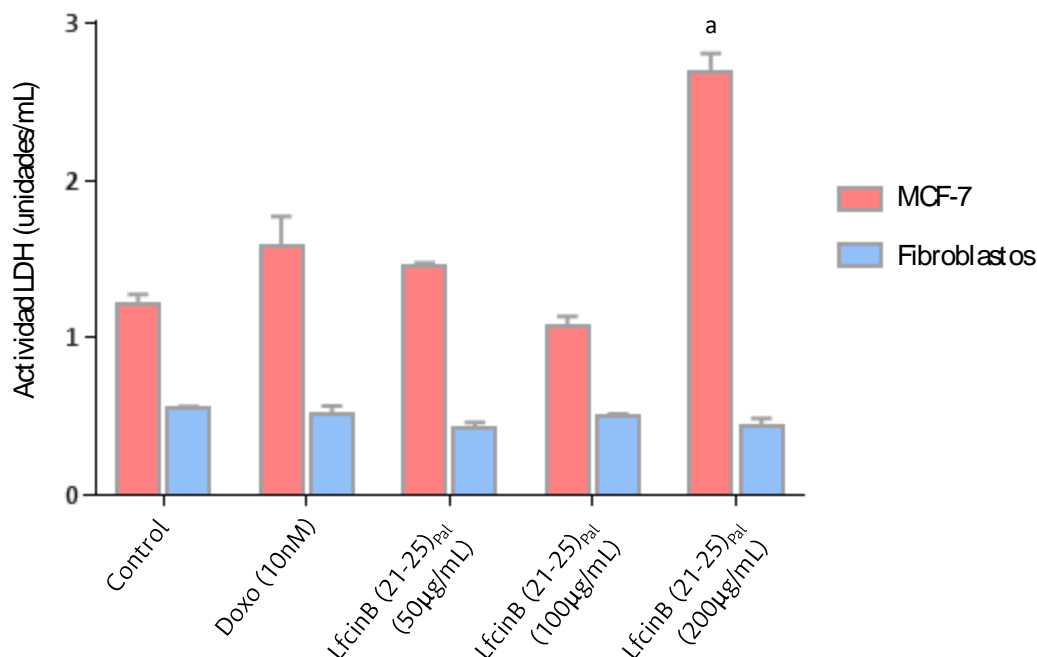


Figura 12. Actividad de LDH en células MCF-7 y fibroblastos a 2 horas de incubación con el péptido LfcinB (21-25)_{Pal} a 50, 100 y 200 µg mL⁻¹. ± S.D (n=2) ANOVA Post hoc Tukey. ^a p < 0.0001 diferencias estadísticamente significativas respecto al control.

4.4 Estudio preliminar del mecanismo de acción de LfcinB (21-25)_{Pal}

El péptido LfcinB (21-25)_{Pal} fue aquel que presentó mayor efecto citotóxico sobre las líneas celulares derivadas de cáncer evaluadas, donde se observó que su acción es rápida y se mantiene el tiempo, siendo dependiente de la concentración; además, no ejerció afectación sobre el cultivo primario de fibroblastos humanos normales. Dado lo mencionado, este péptido fue seleccionado para evaluar de manera preliminar su mecanismo de acción frente a la línea celular MCF-7, la cual es un modelo establecido ampliamente utilizado en este tipo de estudios y cuya sensibilidad es menor comparada con otras líneas celulares permitiendo evidenciar los cambios generados.

4.4.1 Afectación de la membrana plasmática

Mediante citometría de flujo con los fluorocromos SYTO 9, el cual permea la membrana celular uniéndose al DNA, y IP el cual no tiene la capacidad de permear la membrana y sólo

se une al DNA cuando esta se encuentra comprometida; fue posible evidenciar el efecto membranólítico del péptido sobre las células MCF-7. En este ensayo las células marcadas únicamente con SYTO 9 son aquellas células vivas cuya membrana se mantiene íntegra, mientras que aquellas que presentan doble marcación SYTO 9/IP son denominadas muertas donde la membrana citoplasmática se vio afectada por la acción del péptido.

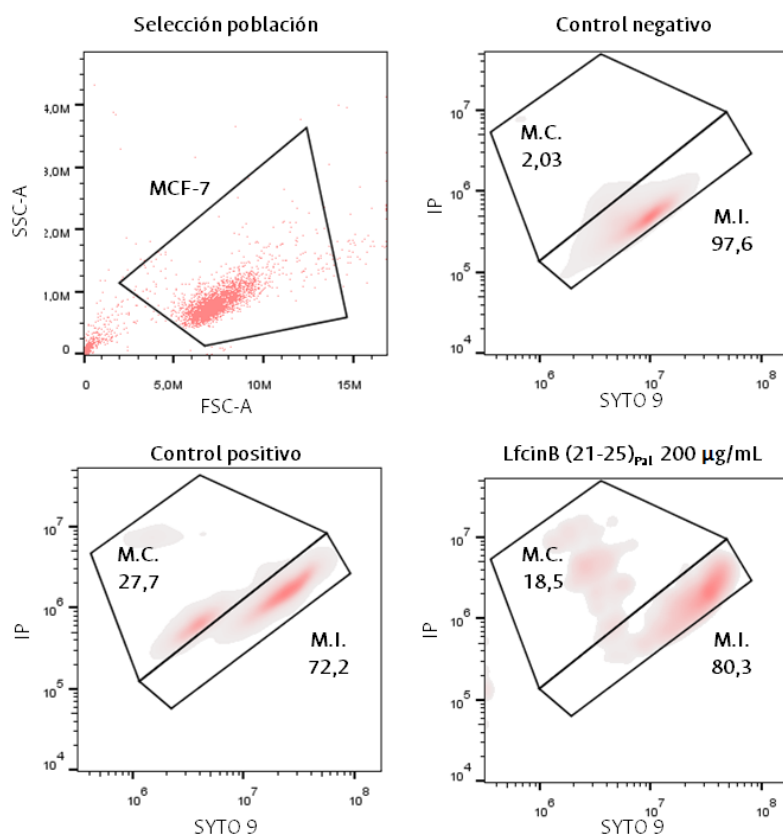


Figura 13. Plots representativos de la determinación de integridad de membrana de MCF-7 mediante citometría de flujo donde M.C. corresponde a porcentaje eventos con membrana comprometida y M.I. a porcentaje de eventos con membrana íntegra. Control negativo; Células sin tratamiento. Control positivo: células tratadas con actinomicina 10 µg mL⁻¹. Péptido: LfcinB (21-25)_{Pal} 200 µg mL⁻¹ a 2 horas.

Mediante este ensayo fue posible diferenciar las poblaciones que presentaban la membrana íntegra (M.I) de las que presentaban una disrupción de la membrana estando ésta comprometida (M.C) (Fig. 13), se observó que en las células no tratadas sólo el 2% de eventos corresponden a células con la membrana comprometida, lo que indica que el cultivo estaba en buenas condiciones, el tratamiento con actinomicina generó un aumento significativo de dicho porcentaje de disrupción de membrana hasta un 28%. De manera

similar, se determinó que el péptido palindrómico tiene efecto membranolítico significativo con el 20% de los eventos leídos pertenecientes a células con membrana comprometida (Fig. 14), dicho comportamiento concuerda con lo observado para el ensayo de LDH donde se evidencia esta afectación por la reducción de NAD^+ . Estos resultados también concuerdan con lo observado para el péptido LfcinB (20-25)₄ el cual a la misma concentración y línea celular presentó cerca del 83% de eventos de células con membrana íntegra [54], similares a lo obtenido para el palíndromo, sugiriendo que en ambos casos el 20% de los eventos podrían estar relacionados bien sea con procesos necróticos o de apoptosis tardía.

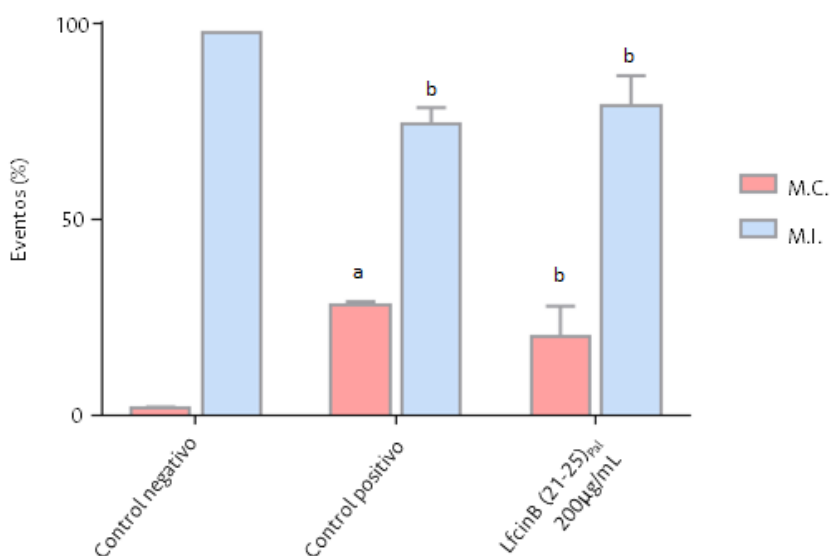


Figura 14. Efecto sobre la membrana citoplasmática de MCF-7 medido por citometría de flujo, las barras rojas representan eventos de membrana comprometida y las azules de membrana íntegra. Control negativo: Células sin tratamiento. Control positivo: células tratadas con actinomicina $10 \mu\text{g mL}^{-1}$. Péptido: LfcinB (21-25)_{Pal} $200 \mu\text{g mL}^{-1}$ a 2 horas. \pm S.D (n=3) ANOVA Post hoc Tukey. ^a $p < 0.001$ y ^b $p < 0.005$ diferencias estadísticamente significativas respecto al control negativo.

4.4.2 Determinación apoptosis/necrosis

Con el ensayo de citometría utilizando el sistema Anexina-V y 7-AAD para la determinación de apoptosis / necrosis se evaluó la exposición de fosfatidilserina en la capa externa de la membrana citoplasmática mediante su tinción con anexina-V FITC, marcando así células que hayan iniciado proceso apoptótico. Además, mediante la incorporación de 7-AAD el

cual es un compuesto fluorescente que se une al DNA es posible distinguir también células necróticas debido a que no puede atravesar la membrana a menos que esta no esté íntegra.

En la Fig. 15 A se observa que en las células tratadas con el péptido LfcinB (21-25)_{Pal} (naranja) se da un corrimiento en la fluorescencia medida para 7-AAD de forma que el 13% de la población presenta la membrana comprometida. Mientras que cuando se analiza los cambios de la fluorescencia para Anexina-V se evidencia que cerca del 53% de los eventos son positivos, mostrando la tendencia a generar mayor cantidad de eventos apoptóticos que necróticos.

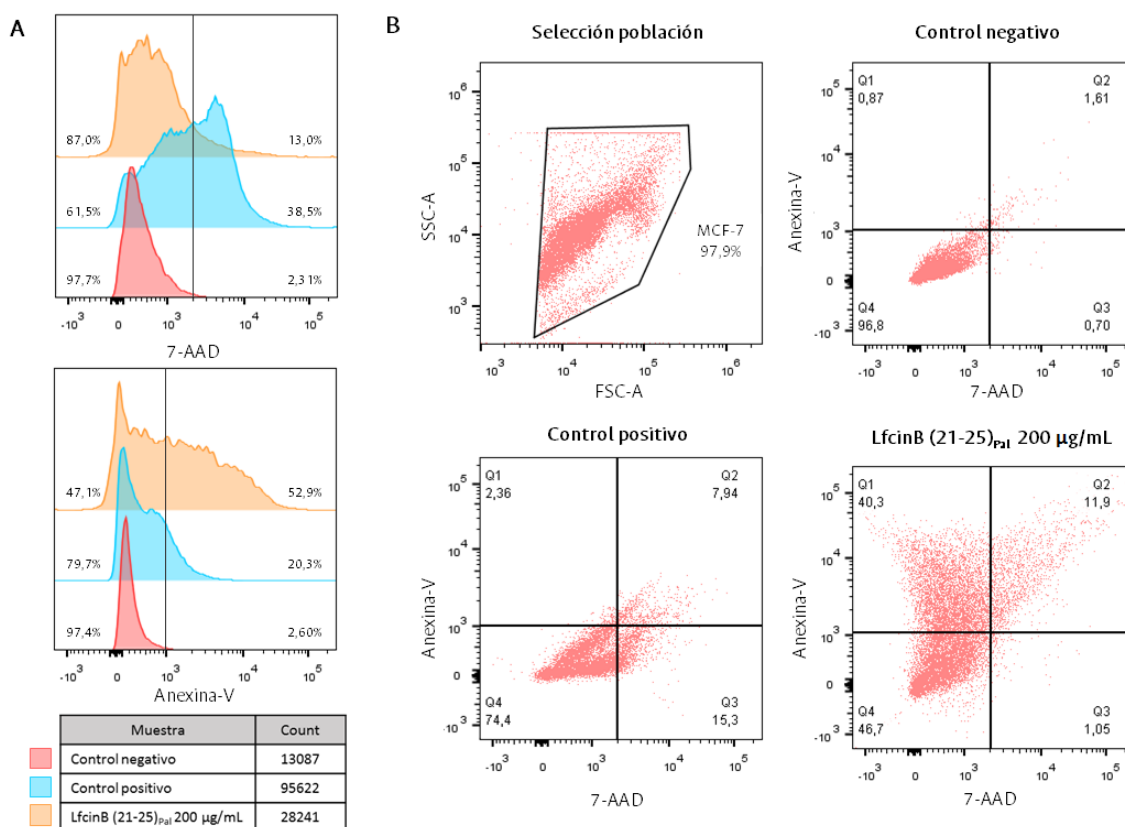


Figura 15. Ensayo de citometría de flujo para determinación de apoptosis y necrosis en células MCF-7 tratadas con el péptido LfcinB (21-25)_{Pal} a 200 µg mL⁻¹ por 2 horas. **A.** Histogramas representativos del cambio en la fluorescencia de los tratamientos evaluados células no tratadas (rojo), células tratadas con doxorrubicina 10 nM (azul) y células tratadas con péptido (naranja). **B.** Plots representativos de los tratamientos frente a los canales de 7-AAD y Anexina-V, Q1: eventos en apoptosis temprana, Q2: eventos en apoptosis tardía, Q3: eventos en necrosis y Q4: eventos vivos.

En la Fig. 15 B se observan los eventos graficados en cuatro cuadrantes, (i) en Q1 eventos apoptóticos tempranos donde sólo hay exposición de fosfatidilserina, observando el 40,3% de la población tratada con el péptido, (ii) en Q2 eventos de apoptosis tardía en los cuales hay tanto exposición de fosfatidilserina como afectación de la membrana citoplasmática, 12% de los eventos se encuentran en este cuadrante, (iii) en Q3 observamos eventos necróticos como consecuencia de pérdida de la integridad de membrana siendo estos el 1,5% de la población; (iv) finalmente en Q4 encontramos eventos generados por células vivas sin afectación, las cuales representan cerca del 47% del total de eventos. Este porcentaje de células vivas concuerda con lo observado en ensayos MTT, donde la viabilidad celular fue cercana al 50% en ambos ensayos donde las células fueron incubadas con la misma concentración de péptido. Mediante este ensayo fue posible determinar que el efecto citotóxico ejercido por el péptido palindrómico sobre las células MCF-7 es rápido y posiblemente está mediado por eventos apoptóticos. Además, estos resultados concuerdan con los obtenidos en el ensayo de SYTO 9/IP donde cerca del 20% de los eventos correspondieron a células con membrana comprometida, lo que nos permite sugerir que dicha pérdida de integridad de membrana puede ser generada en mayor medida por eventos de apoptosis tardía que por eventos necróticos.

Efectos similares se han observado en péptidos cortos derivados del motivo mínimo como el péptido LfcinB (20-25)₄ frente al mismo modelo celular y frente a líneas derivadas de OSCC [49] [54], sin embargo, es importante considerar que aunque este no es el único mecanismo que puede estar asociado a la toxicidad, si son los eventos apoptóticos los que se evidencian mayoritariamente.

En el cultivo primario de fibroblastos humanos normales tratado con el péptido palindrómico no se observó la generación de eventos apoptóticos o necróticos, corroborando el efecto citotóxico selectivo del péptido evidenciado en los ensayos MTT (Anexo 13).

4.4.3 Despolarización de membrana mitocondrial

Para corroborar la generación de eventos apoptóticos se marcaron las células con el fluorocromo JC-1 (Ioduro de tetraetil-benzimidazolilcarbocianina) el cual permea la membrana y se acumula en la mitocondria cambiando su rango de emisión de 529 a 590 nm; sin embargo, cuando la membrana se despolariza la relación 529/590 disminuye drásticamente debido a la baja acumulación. Esta despolarización es característica de eventos apoptóticos donde se da la disrupción de la membrana mitocondrial [83].

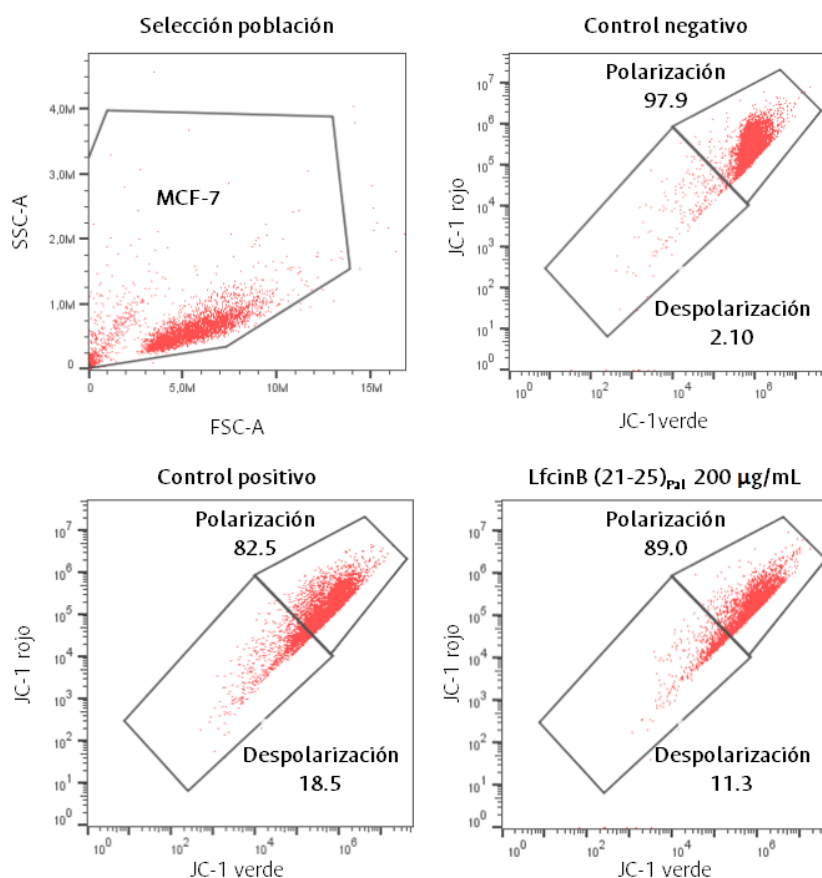


Figura 16. Plots representativos del cambio en el potencial de membrana mitocondrial de células MCF-7 mediante citometría de flujo. Control negativo: células sin tratamiento. Control positivo: células tratadas con actinomicina 10 µg mL⁻¹. Péptido: LfcinB (21-25)_{Pal} 200 µg mL⁻¹ a 2 horas.

En la Fig. 16 se observa el cambio en la relación de fluorescencia de JC-1 dependiente del potencial de la membrana mitocondrial, de forma que se obtienen el porcentaje de eventos pertenecientes a polarización y despolarización de esta. Se evidencia que en las

células no tratadas cerca del 98% de eventos corresponden a mitocondrias funcionales tal como se esperaba, en aquellas tratadas con actinomicina se da un aumento en eventos de despolarización del 18% y para las células tratadas con el péptido palindrómico se evidencia que el 12% de los eventos pertenecen a membrana despolarizada (Fig. 17). Este comportamiento es concordante con los ensayos realizados donde se infieren eventos apoptóticos generados por la actividad citotóxica del palíndromo sobre células MCF-7. La pérdida del potencial de membrana se relaciona con la permeabilidad de esta dada por la salida del citocromo C de la mitocondria que conduce a la formación del apoptosoma y posterior desencadenamiento de los efectores propios de la muerte programada [84].

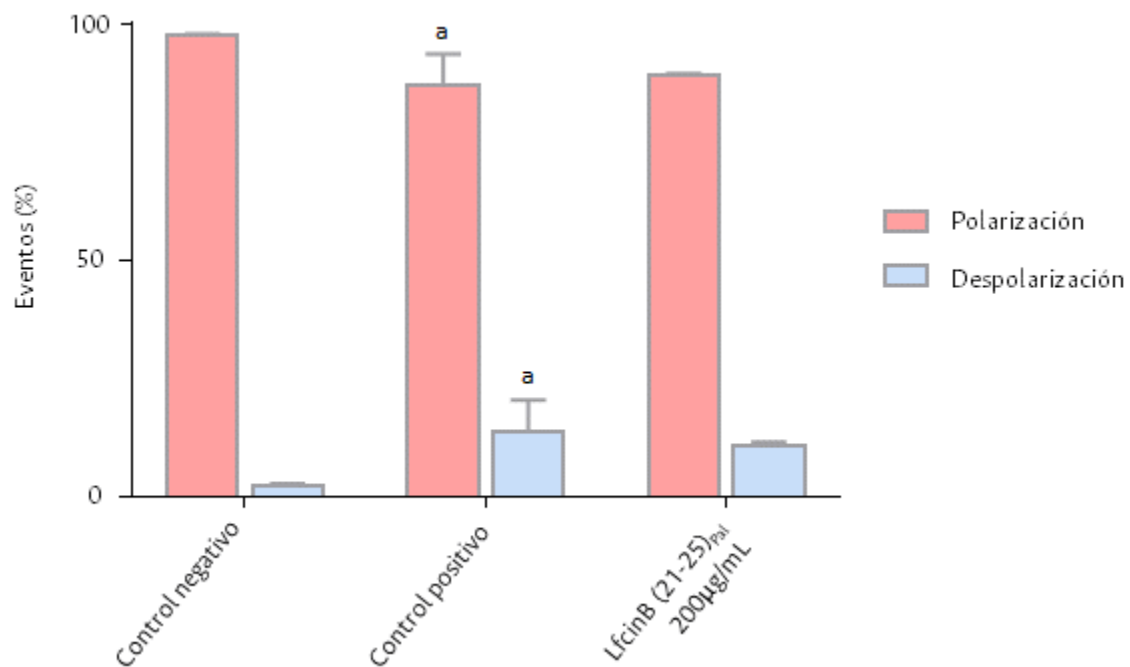


Figura 17. Efecto sobre el potencial de membrana mitocondrial de células MCF-7 medido por citometría de flujo, las barras rojas representan eventos de polarización y las azules de despolarización. Control negativo; Células sin tratamiento. Control positivo: células tratadas con actinomicina $10 \mu\text{g mL}^{-1}$. Péptido: LfcinB (21-25)_{pal} $200 \mu\text{g mL}^{-1}$ a 2 horas. \pm S.D (n=3) ANOVA Post hoc Tukey. ^a $p < 0.05$ diferencias estadísticamente significativas respecto al control negativo.

4.4.4 Cambio en la expresión relativa de genes pro y anti apoptóticos

Para determinar si el efecto citotóxico generado por el péptido LfcinB (21-25)_{Pal} era dado por cambios en la expresión relativa de genes tanto pro como anti apoptóticos se realizó la extracción de RNA de células MCF-7 y fibroblastos tratadas por 2 y 24 horas con 200 µg/mL de péptido, como control negativo células sin tratamiento y como control positivo células tratadas con doxorrubicina 10 nM (Tabla 5). Estas muestras fueron sometidas a retrotranscripción para obtener cDNA, sobre el cual se realizaron qPCR para los genes que codifican para Survivina, Bcl2, Apaf-1, Bid, Caspasa 3, Bax y SMAC (Fig. 18) (Anexo 14-15).

Tabla 5. Parámetros de extracción de RNA

Células	Tratamiento	260 nm	280 nm	320 nm	260/320	RNA (µg/mL)
MCF-7	Control negativo	0.425	0.260	0.081	1.92	14.0
	Doxorrubicina	0.218	0.112	0.004	1.981	8.6
	Péptido/2 h	0.193	0.095	0.010	2.153	7.3
	Péptido /24 h	0.524	0.269	0.013	1.996	20.0
Fibroblastos	Control negativo	0.235	0.110	0.022	2.420	8.5
	Doxorrubicina	0.274	0.126	0.015	2.171	9.6
	Péptido/2 h	0.200	0.091	0.036	2.198	6.6
	Péptido /24 h	0.348	0.189	0.039	2.060	12.0

Para la línea celular MCF-7 se observó aumento en la expresión de Survivina como respuesta al tratamiento con el péptido en ambos tiempos y a la doxorrubicina, lo cual indica que aquellas células que permanecieron luego del tratamiento activaron parte de su maquinaria anti-apoptótica para mantener su viabilidad.

Respecto a Bcl-2 su expresión no presentó diferencias significativas entre los tratamientos evaluados, un efecto similar se observó para las células tratadas con Fe-LFB, de forma contraria, el tratamiento con Apo-LFB generó un aumento en la expresión de Bcl-2 [85]. Este comportamiento es acorde con el hecho que Bcl-2 es una proteína anti-apoptótica

encargada de proteger a la célula de diferentes alteraciones citotóxicas [86] esta se ve sobre-expresada bajo estímulos inductores de apoptosis como genisteína [87] conforme aumenta su concentración con el fin de proteger e inhibir su efecto sobre las células; sin embargo, bajo altas concentraciones de doxorrubicina el gen que la codifica se ve levemente suprimido inhibiendo la expresión de Bcl-2 [88]. De forma similar, se puede observar que la ausencia del aumento de la expresión relativa de este gen causado por el péptido y doxorrubicina, puede ser debido a la supresión de la activación de este mediador anti-apoptótico permitiendo que la muerte celular se dé.

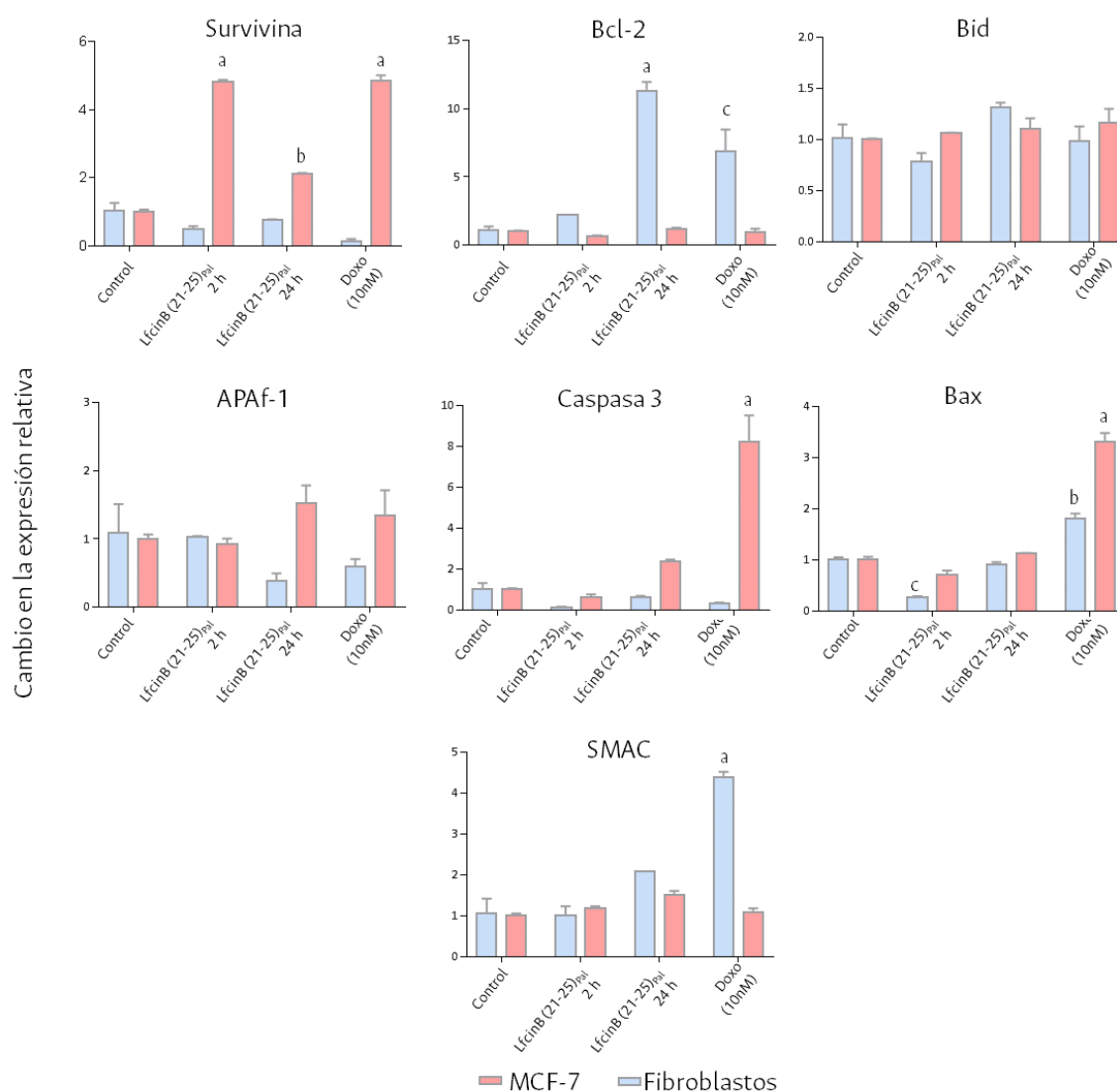


Figura 18. Cambio en la expresión relativa de genes pro y anti-apoptóticos en células MCF-7 y fibroblastos como respuesta a la exposición a $200 \mu\text{g mL}^{-1}$ LfcinB (21-25)_{paI} por 2 y 24

horas. \pm S.D (n=2) ANOVA Post hoc Tukey. ^a $p < 0.0001$, ^b $p < 0.0005$ y ^c $p < 0.005$ diferencias estadísticamente significativas respecto al control.

El efecto ejercido en la expresión relativa de Pro-caspasa 3 por el péptido a las 24 horas generó aumento en su expresión, el cual fue mayor al observado para las células tratadas con LFB en su forma Apo y unida a Fe [85], también se observó un comportamiento similar cuando las células se trataron con doxorrubicina.

Para Apaf-1 se evidenció un efecto similar con un leve aumento de su expresión tanto a las 24 horas de incubación con el péptido como con el tratamiento con doxorrubicina; de igual forma ocurrió para SMAC donde a 24 horas de actividad se evidencia un aumento de su expresión relativa en 0,5 siendo este aumento similar al reportado para LFB [85] y mayor al evidenciado para doxorrubicina, estos patrones podrían sugerir la tendencia a la activación de la maquinaria necesaria para iniciar el proceso apoptótico.

En la expresión de Bax no se evidenciaron cambios frente a los tratamientos del péptido evaluados, dicha ausencia de aumento o disminución de la expresión relativa de este gen se reportó de igual manera para el efecto ejercido por Apo-LFB y Fe-LFB [85] siendo los datos del péptido congruentes con la actividad de la proteína nativa.

Cuando se evaluó el cultivo primario de fibroblastos se observó para Bcl-2 una respuesta rápida con aumento en su expresión a 2 horas de incubación con LfcinB (21-25)_{Pal} generando así la activación de la respuesta anti-apoptótica; estos resultados son congruentes con lo observado en los ensayos de MTT donde el péptido no generó citotoxicidad frente a estas células. Los demás genes evaluados no presentaron aumento ni disminución significativa de su expresión relativa lo cual permite sugerir que el péptido no genera efecto sobre los genes pro y anti-apoptóticos evaluados.

5. Conclusiones

El péptido palindrómico LfcinB (21-25)_{Pal}: RWQWRWQWR presentó efecto citotóxico frente a las líneas derivadas de cáncer de mamá MDA-MB-468, MDA-MB-231 y MCF-7, dicho efecto fue dependiente de la concentración, rápido (2 horas) manteniéndose hasta 48 horas y selectivo.

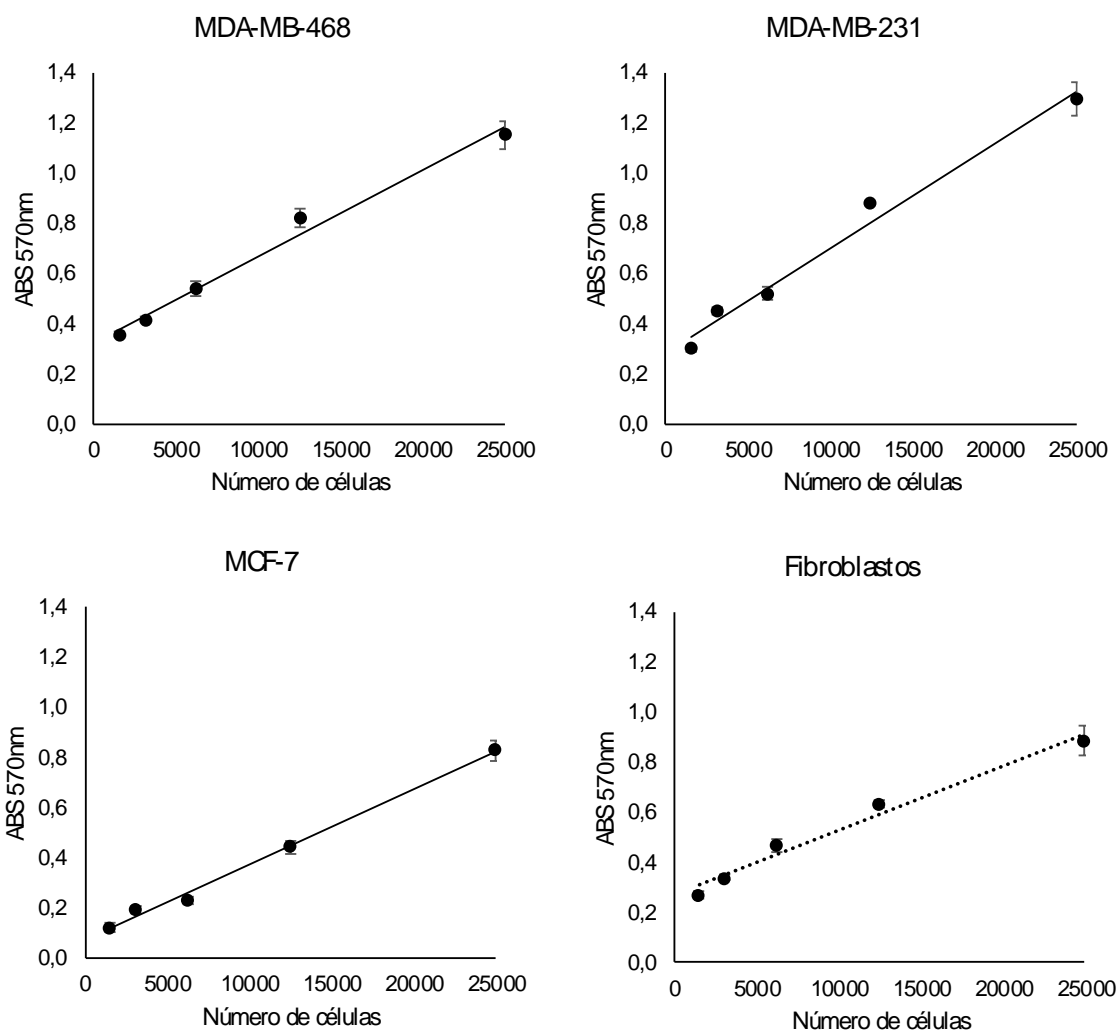
La actividad citotóxica del péptido palindrómico fue mayor a la ejercida por el motivo mínimo del cual se derivó (RRWRWR), sugiriendo que el diseño palindrómico permite incrementar el efecto citotóxico sobre líneas celulares de cáncer de mama.

El diseño experimental de este trabajo permitió identificar nueve péptidos que ejercen efecto citotóxico sobre las tres líneas celulares evaluadas.

Se evidenció que el cambio en cualquiera de los aminoácidos de la secuencia palindrómica genera disminución en la actividad citotóxica contra líneas celulares de cáncer de mama y no se evidenció cambios significativos de elementos de estructura secundaria entre el palíndromo y sus análogos.

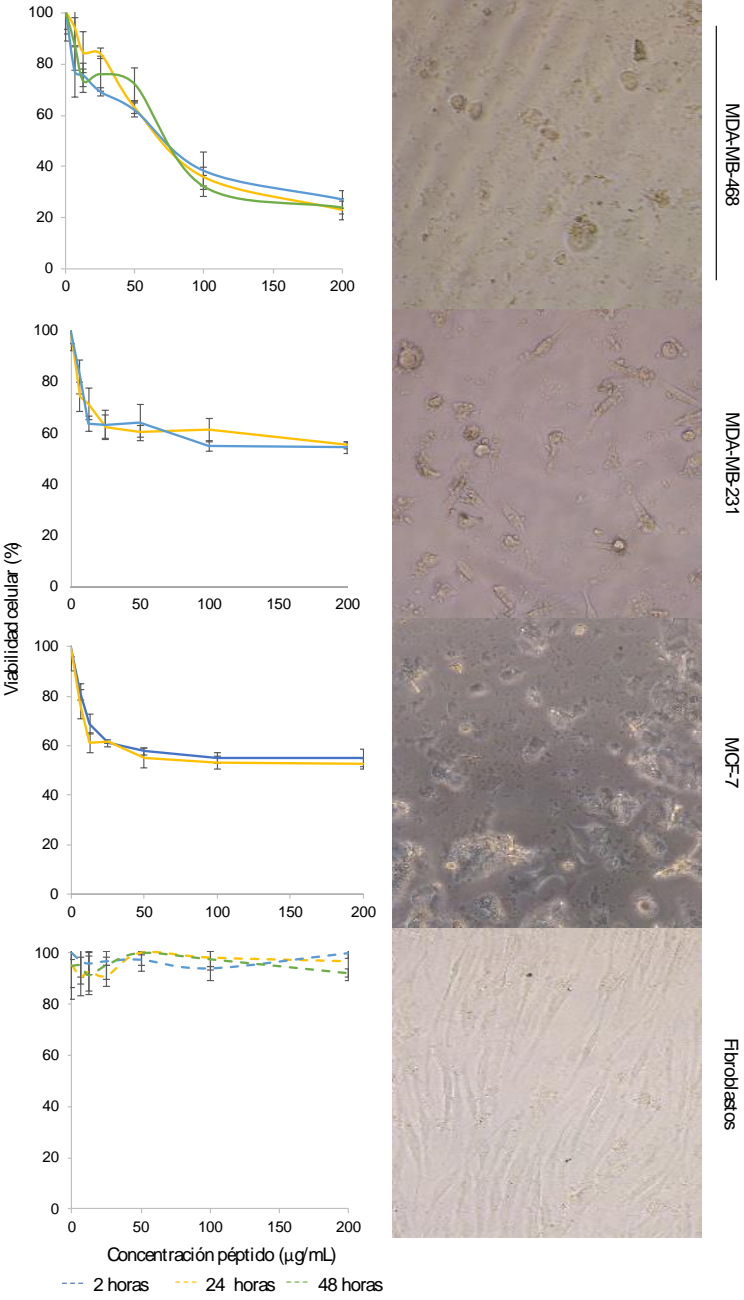
Los resultados obtenidos permiten sugerir que el mecanismo de acción asociado al efecto citotóxico del péptido palindrómico LfcinB (21-25)_{Pal} contra células MCF-7 está mediado principalmente por eventos apoptóticos.

Anexo 1: Curvas de calibración de las diferentes líneas celulares, ensayo por MTT

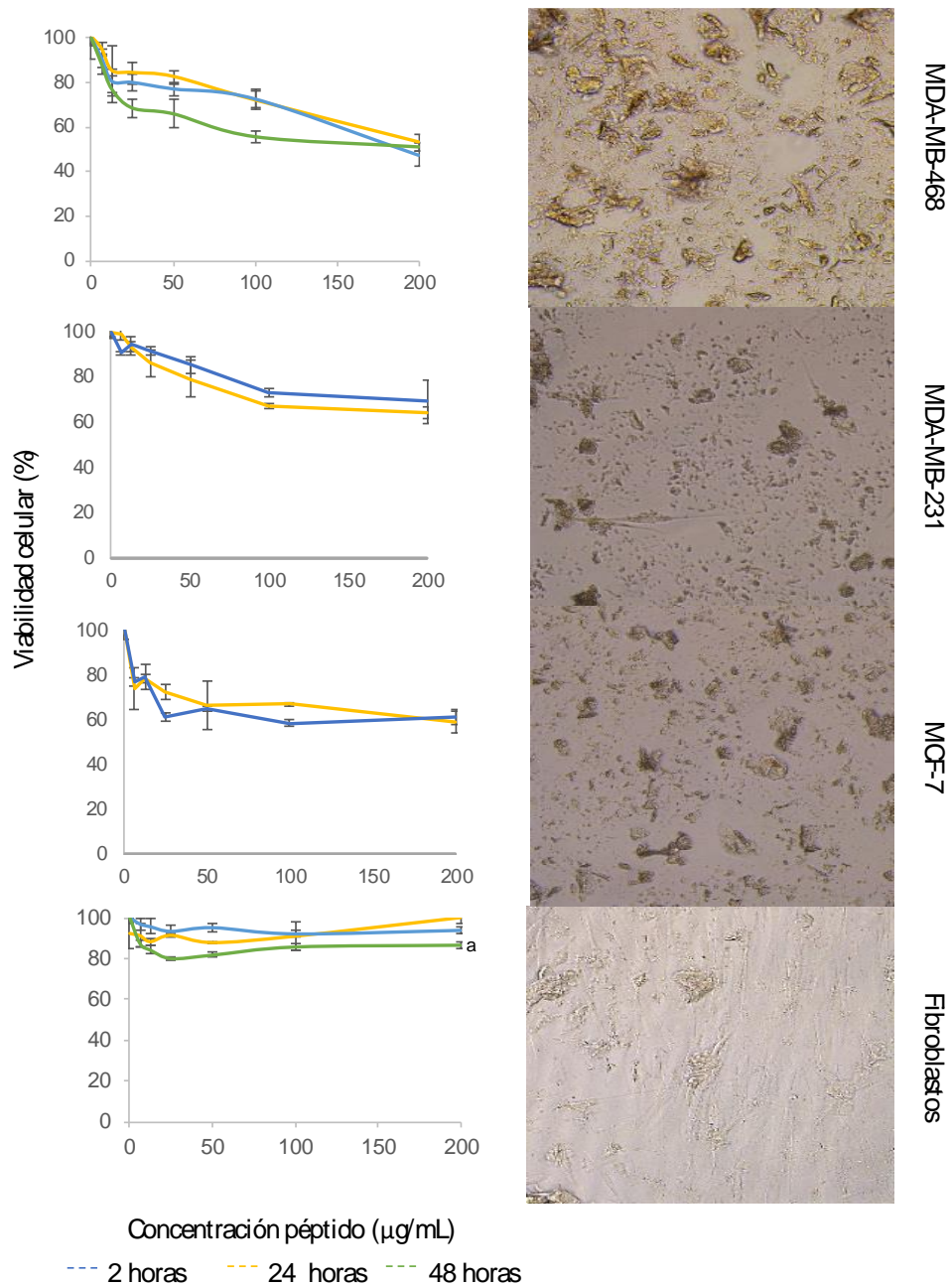


Curvas de calibración obtenidas para las diferentes líneas celulares utilizadas en este estudio MDA-MB-468, MDA-MB-231, MCF-7 y cultivo primario de fibroblastos humanos normales \pm S.D. ($n = 3$).

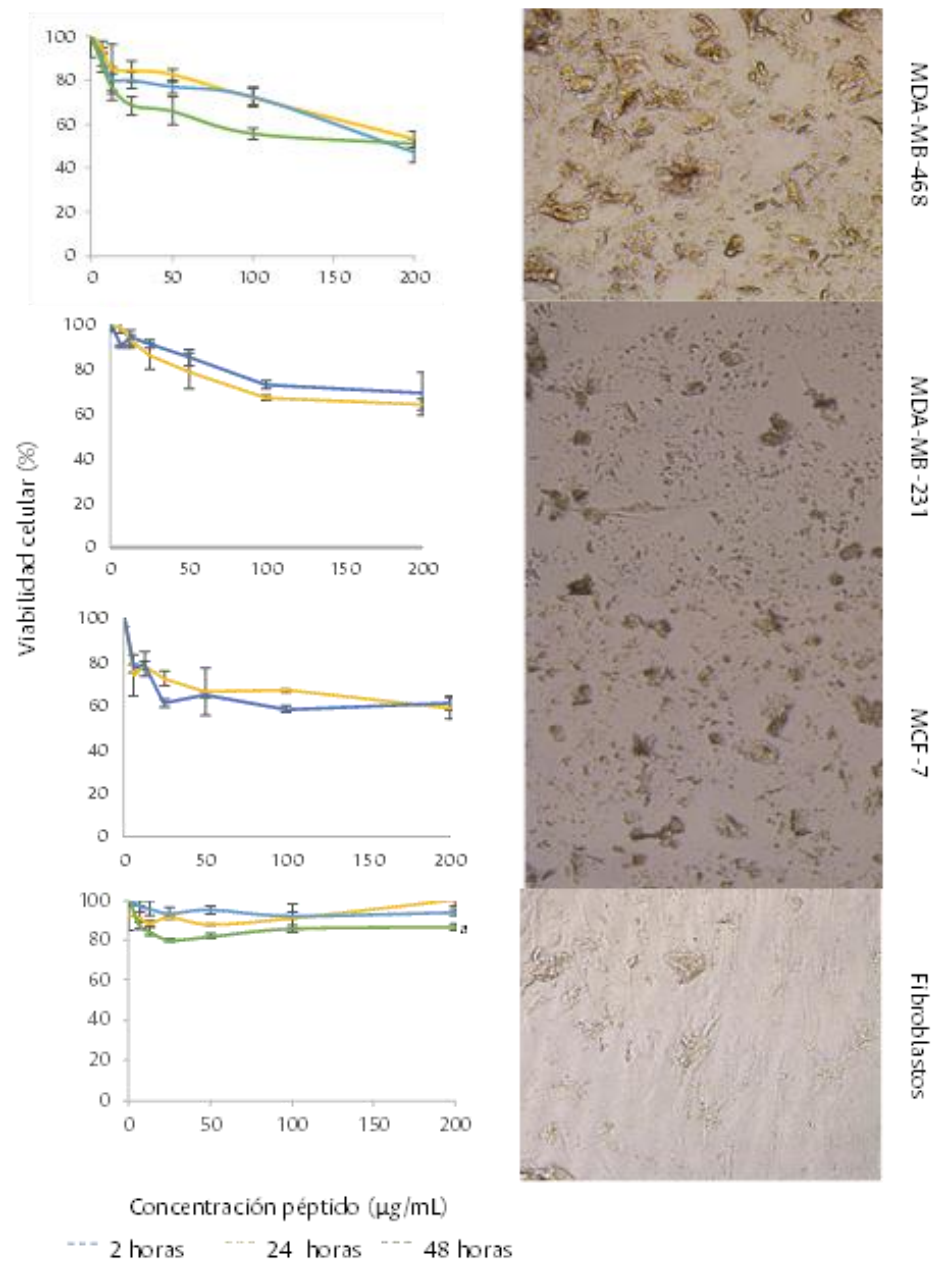
Anexo 2: Efecto del péptido LfcinB(21-25)_{Pal} sobre las células evaluadas



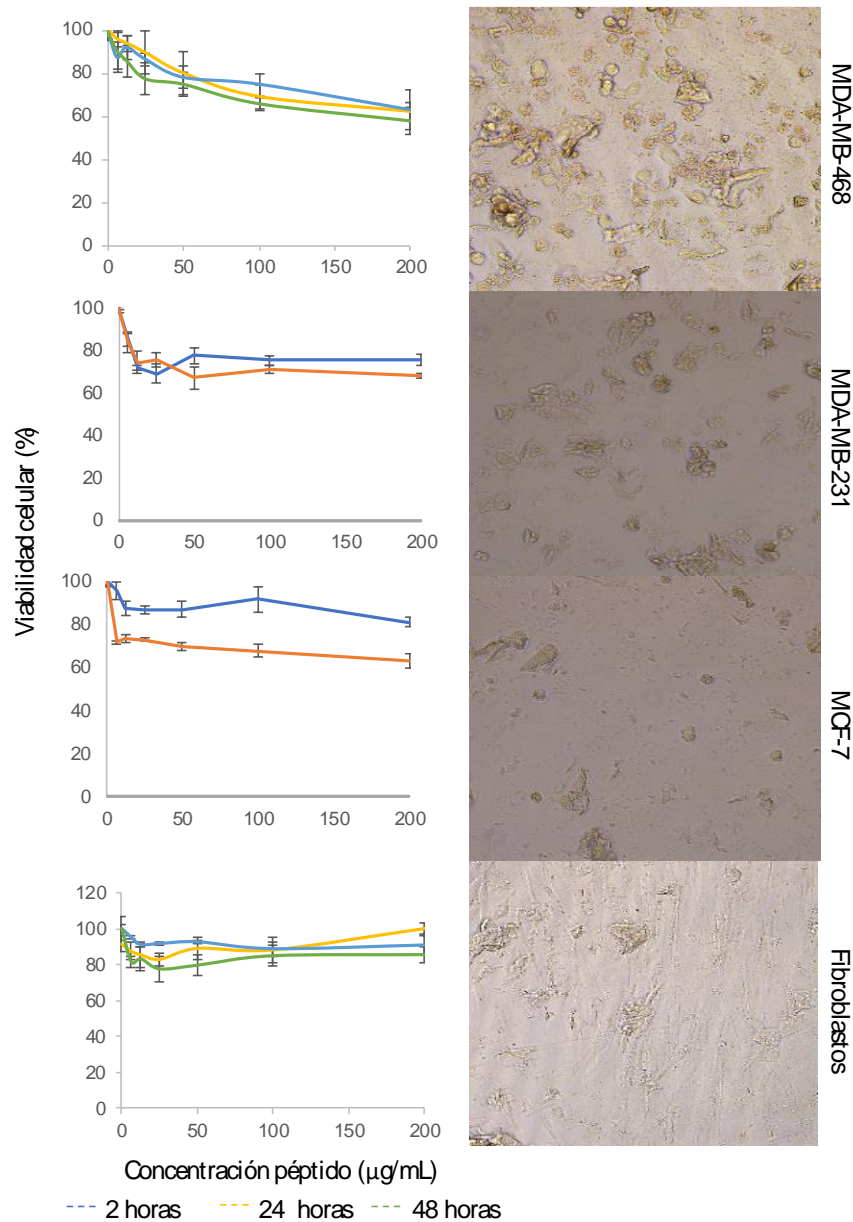
Anexo 3: Efecto del péptido [¹Ala] LfcinB(21-25)_{Pal} sobre las células evaluadas



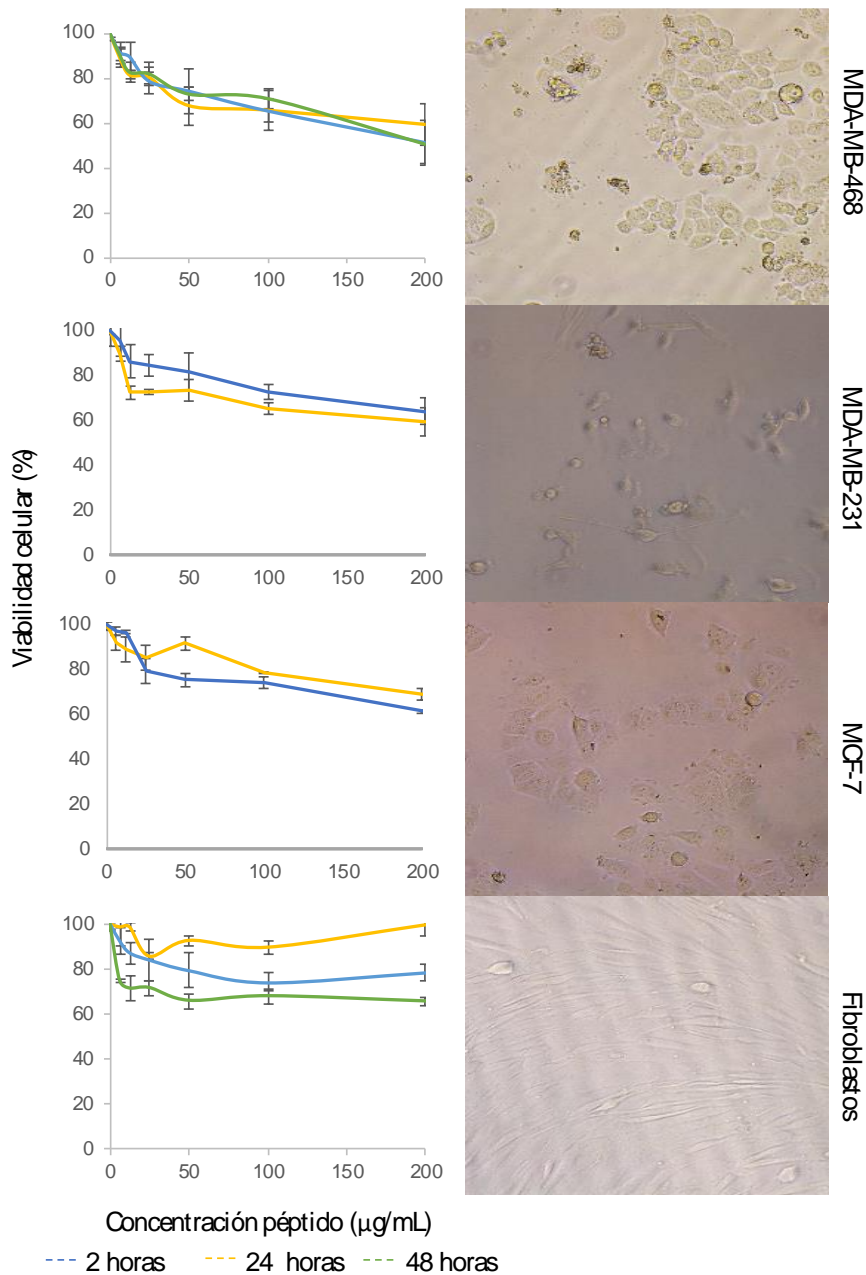
Anexo 4: Efecto del péptido [²Ala] LfcinB(21-25)_{Pal} sobre las células evaluadas



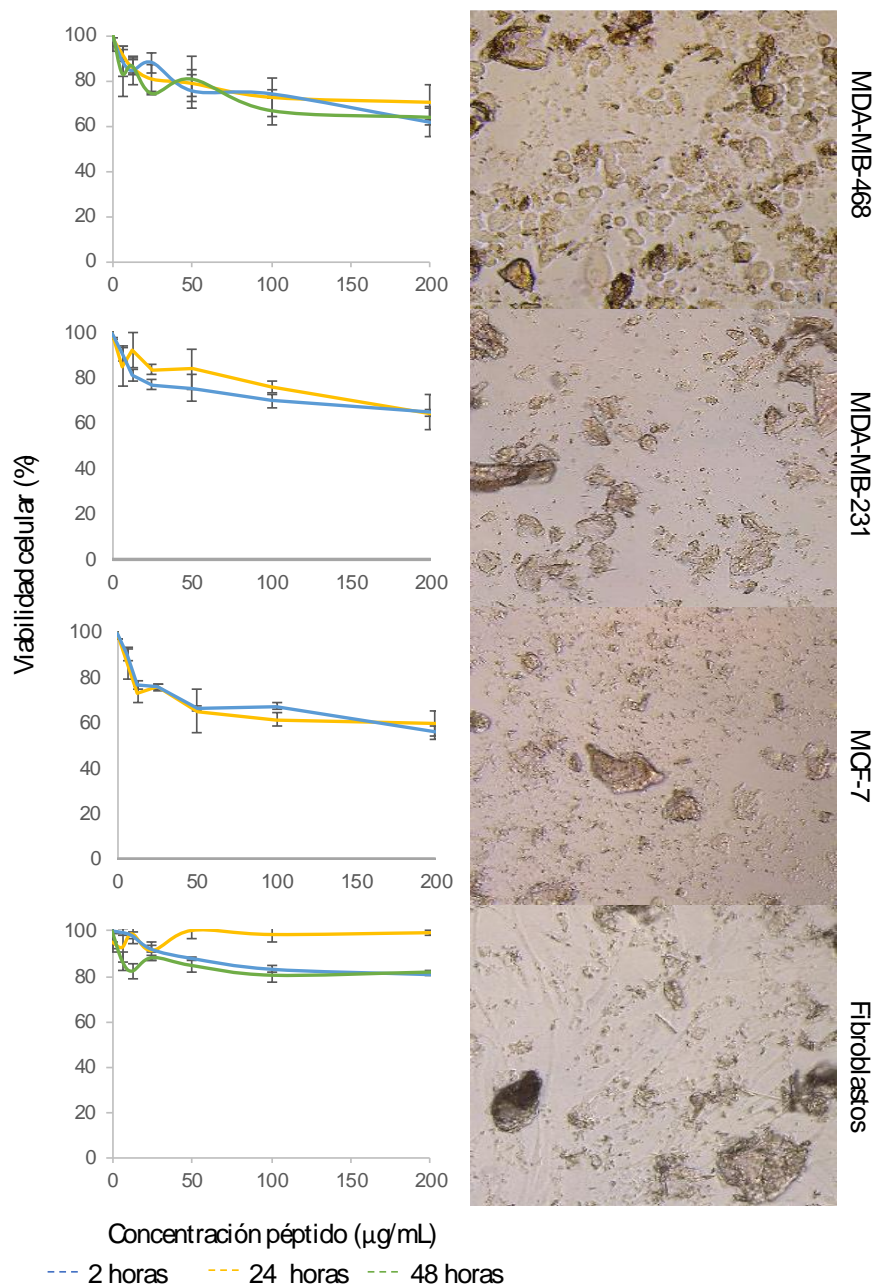
Anexo 5: Efecto del péptido [³Ala] LfcinB(21-25)_{Pal} sobre las células evaluadas



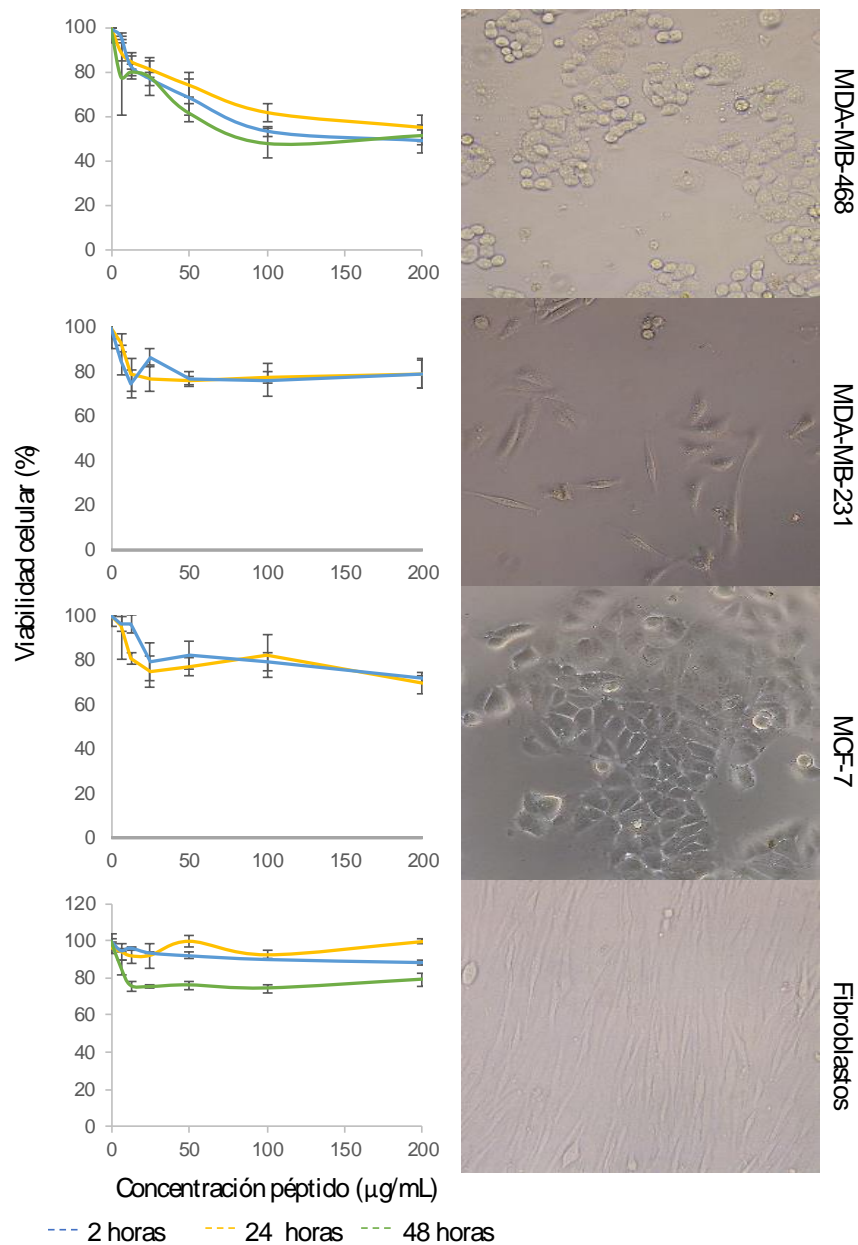
Anexo 6: Efecto del péptido [⁴Ala] LfcinB(21-25)_{Pal} sobre las células evaluadas



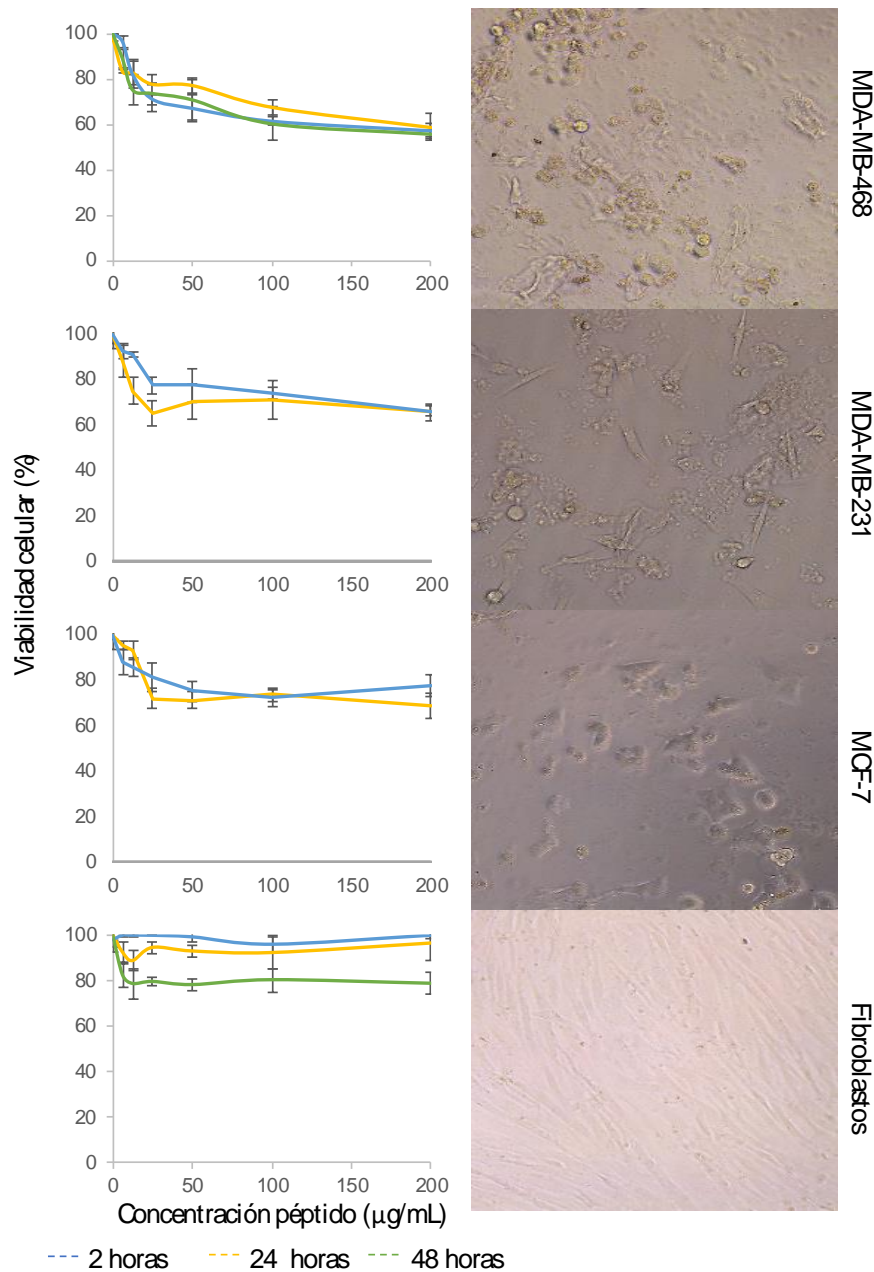
Anexo 7: Efecto del péptido [⁵Ala] LfcinB(21-25)_{Pal} sobre las células evaluadas



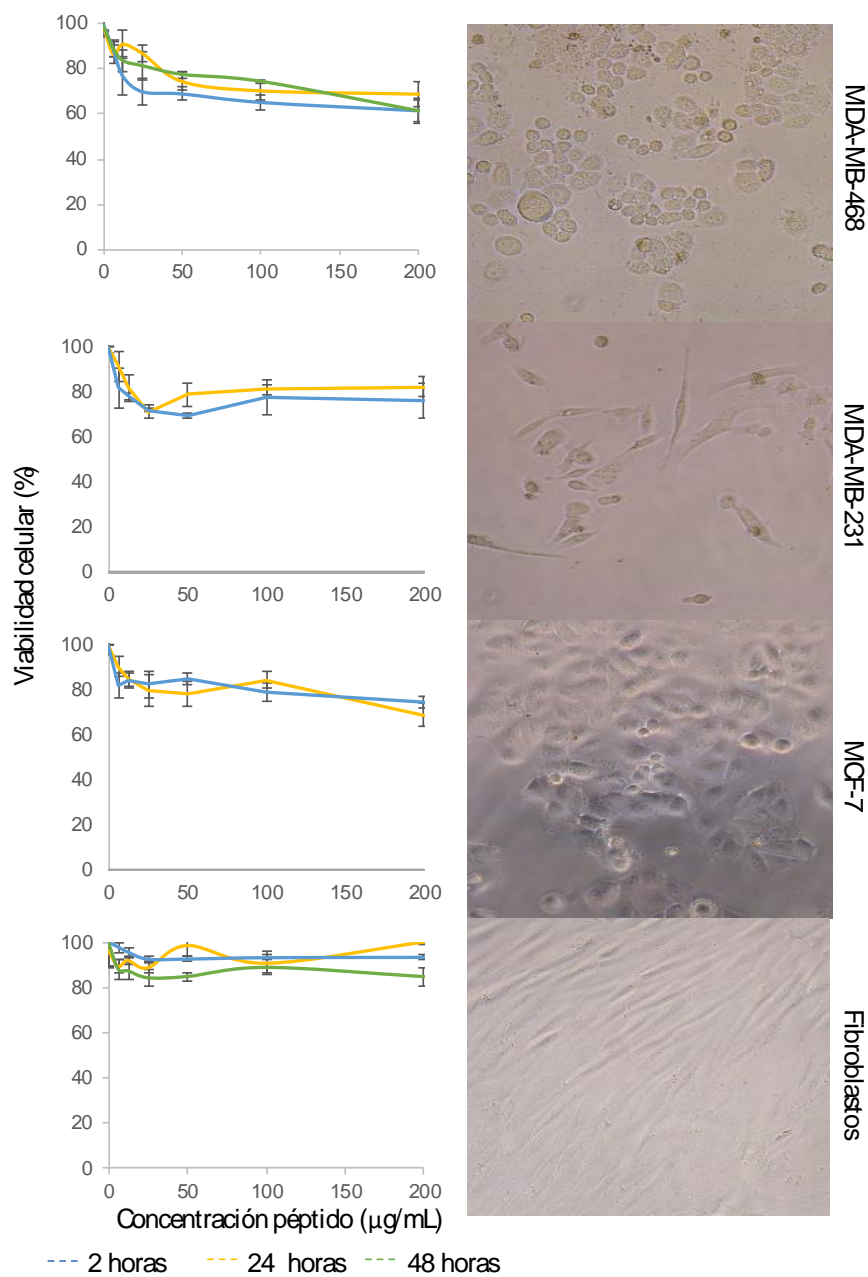
Anexo 8: Efecto del péptido [⁶Ala] LfcinB(21-25)_{Pal} sobre las células evaluadas



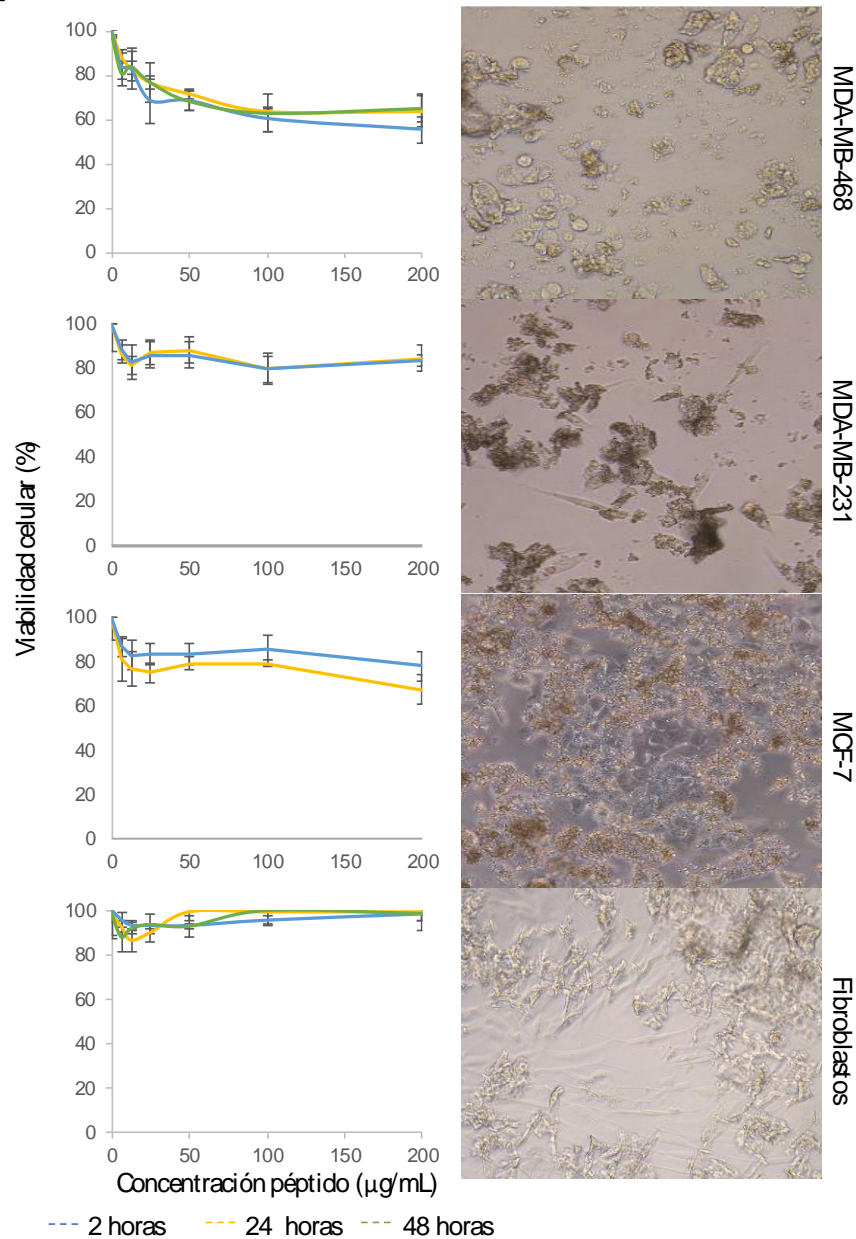
Anexo 9: Efecto del péptido [⁷Ala] LfcinB(21-25)_{Pal} sobre las células evaluadas



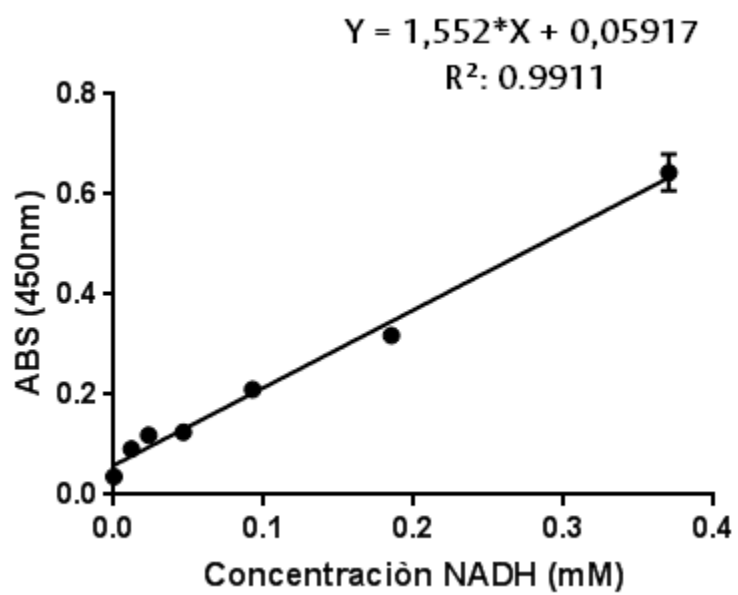
Anexo 10: Efecto del péptido [⁸Ala] LfcinB (21-25)_{Pal} sobre las células evaluadas



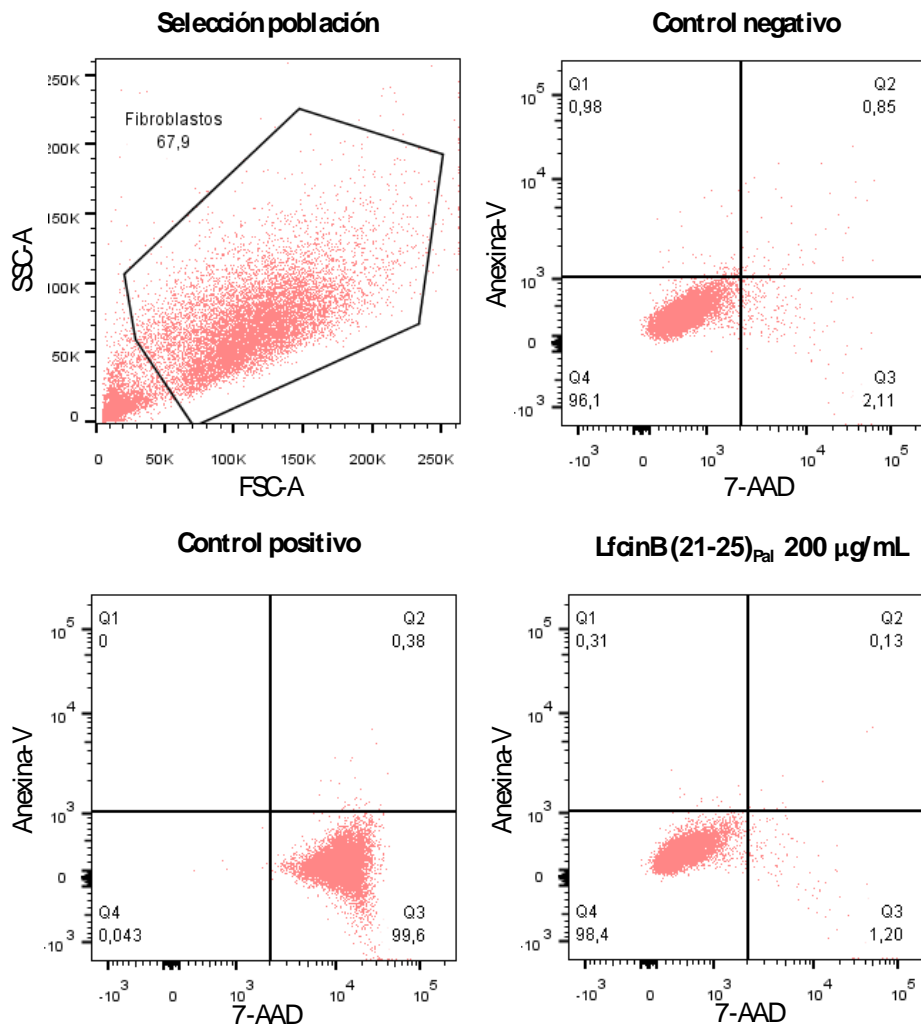
Anexo 11: Efecto del péptido [⁹Ala] LfcinB (21-25)_{Pal} sobre las células evaluadas



Anexo 12: Curva de calibración NADH



Anexo 13: Citometría de flujo apoptós/necrosis en fibroblastos tratados con el péptido LfcinB (21-25)_{Pal} a 200 µg/mL por 2 horas



Anexo 14: Análisis de expresión relativa de genes en MCF-7 por método Livak

	Sample	Cq	Prom
18s	MCF-7 Control	17.49	17.76
	MCF-7 Control	18.02	
	MCF-7 62-24	17.98	17.83
	MCF-7 62-24	17.67	
	MCF-7 62-2	18.52	18.36
	MCF-7 62-2	18.19	
	MCF-7 doxo	19.07	18.84
	MCF-7 doxo	18.60	

	Sample	Cq	Prom	2 ^{^(ΔΔCT)}	Mean fold change in gene expression	Desvest	Coe Var
Survivina	MCF-7 Cntrl	26.80	26.71	0.94	1.00	0.09	0.35
	MCF-7 Cntrl	26.61		1.07			
	MCF-7 62-24	25.73	25.71	2.06	2.10	0.05	0.20
	MCF-7 62-24	25.68		2.14			
	MCF-7 62-2	25.02	25.04	4.87	4.82	0.07	0.28
	MCF-7 62-2	25.05		4.77			
	MCF-7 doxo	25.46	25.51	5.01	4.86	0.21	0.84
	MCF-7 doxo	25.55		4.71			

	Sample	Cq	Prom	2 ^{^(ΔΔCT)}	Mean fold change in gene expression	Desvest	Coe Var
Bid	MCF-7 Cntrl	26.48	26.50	1.01	1.00	0.02	0.07
	MCF-7 Cntrl	26.52		0.99			
	MCF-7 62-24	26.55	26.43	1.01	1.11	0.14	0.51
	MCF-7 62-24	26.30		1.21			
	MCF-7 62-2	27.00	27.01	1.07	1.07	0.01	0.02
	MCF-7 62-2	27.01		1.06			
	MCF-7 doxo	27.20	27.38	1.30	1.16	0.20	0.72
	MCF-7 doxo	27.55		1.02			

	Sample	Cq	Prom	2 ^{^(ΔΔCT)}	Mean fold change in gene expression	Desvest	Coe Var
Caspasa	MCF-7 Cntrl	25.87	25.97	1.07	1.00	0.10	0.38
	MCF-7 Cntrl	26.07		0.93			

	MCF-7 62-24	24.86	24.80	2.27	2.36	0.14	0.56
	MCF-7 62-24	24.74		2.46			
	MCF-7 62-2	27.66	27.31	0.47	0.62	0.21	0.77
	MCF-7 62-2	26.95		0.77			
	MCF-7 doxo	23.80	24.03	9.51	8.21	1.84	7.64
	MCF-7 doxo	24.26		6.92			

	Sample	Cq	Prom	2 ^{ΔΔCT}	Mean fold change in gene expression	Desvest	Coe Var
Bcl-2	MCF-7 Cntrl	20.38	20.45	1.05	1.00	0.06	0.31
	MCF-7 Cntrl	20.51		0.96			
	MCF-7 62-24	20.18	20.27	1.26	1.19	0.10	0.49
	MCF-7 62-24	20.35		1.12			
	MCF-7 62-2	21.53	21.64	0.71	0.67	0.07	0.32
	MCF-7 62-2	21.74		0.62			
	MCF-7 doxo	21.26	21.67	1.20	0.94	0.37	1.70
	MCF-7 doxo	22.08		0.68			

	Sample	Cq	Prom	2 ^{ΔΔCT}	Mean fold change in gene expression	Desvest	Coe Var
Apaf-1	MCF-7 Cntrl	29.93	30.01	1.06	1.00	0.08	0.26
	MCF-7 Cntrl	30.09		0.95			
	MCF-7 62-24	29.25	29.50	1.78	1.52	0.37	1.25
	MCF-7 62-24	29.75		1.26			
	MCF-7 62-2	30.61	30.72	1.00	0.93	0.10	0.33
	MCF-7 62-2	30.83		0.86			
	MCF-7 doxo	30.32	30.72	1.71	1.34	0.51	1.67
	MCF-7 doxo	31.12		0.98			

	Sample	Cq	Prom	2 ^{ΔΔCT}	Mean fold change in gene expression	Desvest	Coe Var
Bax	MCF-7 Cntrl	25.17	25.25	1.06	1.00	0.08	0.31
	MCF-7 Cntrl	25.33		0.95			
	MCF-7 62-24	25.14	25.14	1.13	1.14	0.01	0.02
	MCF-7 62-24	25.13		1.14			
	MCF-7 62-2	26.19	26.37	0.79	0.70	0.12	0.47
	MCF-7 62-2	26.55		0.62			
	MCF-7 doxo	24.53	24.61	3.48	3.31	0.24	0.99
	MCF-7 doxo	24.68		3.14			

	Sample	Cq	Prom	2 ^{^(ΔΔCT)}	Mean fold change in gene expression	Desvest	Coe Var
SMAC	MCF-7 Cntrl	27.33	27.25	0.94	1.00	0.08	0.31
	MCF-7 Cntrl	27.16		1.06			
	MCF-7 62-24	26.63	26.74	1.61	1.50	0.15	0.58
	MCF-7 62-24	26.84		1.39			
	MCF-7 62-2	27.55	27.60	1.23	1.19	0.05	0.19
	MCF-7 62-2	27.64		1.15			
	MCF-7 doxo	28.33	28.21	1.00	1.09	0.13	0.45
	MCF-7 doxo	28.09		1.18			

Anexo 15: Análisis de expresión relativa de genes en fibroblastos por método Livak

	Sample	Cq	Prom
18s	Fib Control	21.70	22.35
	Fib Control	23.00	
	Fib 62-24	21.73	21.56
	Fib 62-24	21.39	
	Fib 62-2	20.15	20.08
	Fib 62-2	20.01	
	Fib doxo	23.29	22.66
	Fib doxo	22.03	

	Sample	Cq	Prom	2 ^{ΔΔCT}	Mean fold change in gene expression	Desvest	Coe Var
Survivina	Fib Control	25.95	25.62	0.80	1.03	0.33	1.27
	Fib Control	25.29		1.26			
	Fib 62-24	25.19	25.22	0.78	0.76	0.02	0.09
	Fib 62-24	25.25		0.75			
	Fib 62-2	24.76	24.45	0.38	0.48	0.14	0.58
	Fib 62-2	24.14		0.58			
	Fib doxo	28.27	29.31	0.20	0.12	0.11	0.36
	Fib doxo	30.35		0.05			

	Sample	Cq	Prom	2 ^{ΔΔCT}	Mean fold change in gene expression	Desvest	Coe Var
Bid	Fib Control	30.16	30.37	1.15	1.01	0.20	0.66
	Fib Control	30.57		0.87			
	Fib 62-24	29.13	29.18	1.36	1.32	0.06	0.22
	Fib 62-24	29.23		1.27			
	Fib 62-2	28.60	28.45	0.70	0.79	0.12	0.42
	Fib 62-2	28.29		0.87			
	Fib doxo	30.95	30.73	0.83	0.98	0.21	0.70
	Fib doxo	30.50		1.13			

	Sample	Cq	Prom	2 ^{ΔΔCT}	Mean fold change in gene expression	Desvest	Coe Var
Caspasa	Fib Control	24.99	24.60	0.76	1.04	0.39	1.59
	Fib Control	24.20		1.31			
	Fib 62-24	24.33	24.48	0.69	0.63	0.09	0.38
	Fib 62-24	24.63		0.56			
	Fib 62-2	25.52	25.24	0.11	0.14	0.04	0.15

	Fib 62-2	24.96		0.16			
	Fib doxo	26.34	26.70	0.37	0.30	0.10	0.38
	Fib doxo	27.05		0.23			

	Sample	Cq	Prom	2 ^{^(ΔΔCT)}	Mean fold change in gene expression	Desvest	Coe Var
Bcl-2	Fib Control	32.21	31.77	0.74	1.05	0.44	1.38
	Fib Control	31.33		1.36			
	Fib 62-24	27.40	27.49	11.96	11.29	0.94	3.42
	Fib 62-24	27.57		10.63			
	Fib 62-2	28.37	28.36	2.19	2.20	0.02	0.08
	Fib 62-2	28.35		2.22			
	Fib doxo	29.00	29.84	8.46	5.55	4.11	13.78
	Fib doxo	30.68		2.64			

	Sample	Cq	Prom	2 ^{^(ΔΔCT)}	Mean fold change in gene expression	Desvest	Coe Var
Apaf-1	Fib Control	31.71	32.31	1.51	1.09	0.60	1.86
	Fib Control	32.90		0.66			
	Fib 62-24	32.53	32.95	0.49	0.39	0.15	0.46
	Fib 62-24	33.36		0.28			
	Fib 62-2	29.98	30.00	1.04	1.02	0.02	0.07
	Fib 62-2	30.02		1.01			
	Fib doxo	33.13	33.40	0.70	0.59	0.15	0.46
	Fib doxo	33.66		0.48			

	Sample	Cq	Prom	2 ^{^(ΔΔCT)}	Mean fold change in gene expression	Desvest	Coe Var
Bax	Fib Control	25.68	25.75	1.05	1.00	0.06	0.25
	Fib Control	25.81		0.96			
	Fib 62-24	25.16	25.09	0.87	0.92	0.07	0.27
	Fib 62-24	25.01		0.96			
	Fib 62-2	25.26	25.41	0.29	0.26	0.04	0.15
	Fib 62-2	25.55		0.24			
	Fib doxo	25.12	25.21	1.91	1.81	0.15	0.60
	Fib doxo	25.29		1.70			

	Sample	Cq	Prom	2 ^{ΔΔCT}	Mean fold change in gene expression	Desvest	Coe Var
SMAC	Fib Control	30.76	30.26	0.70	1.06	0.51	1.67
	Fib Control	29.75		1.42			
	Fib 62-24	28.40	28.40	2.09	2.09	0.00	0.00
	Fib 62-24	28.40		2.09			
	Fib 62-2	27.69	28.01	1.23	1.01	0.31	1.11
	Fib 62-2	28.33		0.79			
	Fib doxo	28.47	28.43	4.27	4.39	0.17	0.61
	Fib doxo	28.39		4.52			

Bibliografía

- [1] J. Gifford, H. Hunter y H. Vogel, «Lactoferricin: a lactoferrin-derived peptide with antimicrobial, antiviral, antitumor and immunological properties,» *Cellular and Molecular Life Sciences*, vol. 62, pp. 2588–2598,, 2005.
- [2] I. Zubairu, K. Babagana, D. Danlami, L. Abdullahi y A. Khan, «Molecular Therapeutic Cancer Peptides: A Closer Look at Bovine Lactoferricine,» *Asian Journal of Biochemistry, Genetics and Molecular Biology*, pp. 1-9, 2018.
- [3] N. D. J. Huertas Méndez, Y. Vargas Casanova, A. K. Gómez Chimbi, E. Hernández, A. L. Leal Castro, J. M. Melo Díaz, Z. J. Rivera Monroy y J. E. García Castañeda, «Synthetic Peptides Derived from Bovine Lactoferricin Exhibit Antimicrobial Activity against E. coli ATCC 11775, S. maltophilia ATCC 13636 and S. enteritidis ATCC 13076,» *Molecules*, vol. 22, pp. 1-10, 2017.
- [4] NIH, «Instituto Nacional del Cáncer,» 2018. [En línea]. Available: <https://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionario/buscar?contains=false&q=cancer>.
- [5] D. Hanahan y R. A. Weinberg, «Hallmarks of Cancer: The Next Generation,» *Cell*, vol. 144, nº 5, pp. 646-674, 2011.
- [6] World Health Organization, «World Health Organization,» 2019. [En línea]. Available: https://www.who.int/health-topics/cancer#tab=tab_1.
- [7] World Cancer Research Fund, «Worldwide cancer data,» 2018. [En línea]. Available: <https://www.wcrf.org/dietandcancer/cancer-trends/worldwide-cancer-data>.
- [8] G. W. Prager, S. Baraga, B. Bystricky, C. Qvortrup, C. Criscitiello, E. Esin, G. S. Sonke, G. Argilés-Martínez, J.-S. Frenel, M. Karamouzis, M. Strijbos, O. Yazici, P. Bossi, S. Banerjee, T. Troiani, A. Eniu, F. Ciardiello, J. Tabernero, C. Zielinski, P. Casali, F.

- Cardoso, . J.-Y. Douillard, S. Jezdic, K. McGregor, G. Bricalli, M. Vyas y . A. Ilbawi, «Global cancer control: responding to the growing burden, rising costs and inequalities in access,» *ESMO Cancer Horizons*, 2018.
- [9] IARC, «Latest global cancer data: Cancer burden rises to 18.1 million new cases and 9.6 million cancer deaths in 2018,» WHO, Lyon , 2019.
- [10] C. Pardo y R. Cendales, «Estimaciones de incidencia y mortalidad para los principales cinco tipos de cáncer en Colombia, 2007-2011,» *Colombia Médica*, vol. 49, nº 1, 2018.
- [11] C. Pardo y E. de Vries, «Breast and cervical cancer survival at Instituto Nacional de Cancerología, Colombia,» *Colombia Médica*, vol. 49, nº 1, pp. 102-108, 2018.
- [12] E. Vergara-Dagobeth, A. Suárez-Causado y R. D. Gómez-Arias, «Plan Control del cáncer en Colombia 2012-2021. Un análisis formal,» *Rev Gerenc Polít Salud.*, pp. 6-18, 2017.
- [13] B. H. L. Howes, D. I. Watson, C. Xu, B. Fosh, M. Canepa y N. R. Dean, «Quality of Life Following Total Mastectomy with and without Reconstruction versus Breast-Conserving Surgery for Breast Cancer: A Case-Controlled Cohort Study,» *J. Plast. Reconstr. Aesthetic Surg.*, vol. 69, nº 9, p. 1184–1191, 2016.
- [14] Breast Cancer Now, «Side effects,» 5 2019. [En línea]. Available: <https://breastcancer.org/information-support/facing-breast-cancer/going-through-breast-cancer-treatment/side-effects/side-effects-radiotherapy>.
- [15] J. Fernebro, «Fighting bacterial infections-future treatment options.,» *Drug Resist Updat*, vol. 14, nº 2, pp. 125-139, 2011.
- [16] J. Castañeda, J. Ortega, A. Vanegas, A. Aquino, J. Serafin, S. Estrada y I. Estrada, «Péptidos antimicrobianos: péptidos con múltiples funciones,» *Alergia, asma e inmunología pediátricas*, vol. 18, nº 1, pp. 16-29, 2009.
- [17] K. Kurrikoff, D. Aphkhazava y U. Lange, «The future of peptides in cancer treatment,» *Current opinion in pharmacology*, vol. 47, p. 27–32, 2019.

- [18] The Global Cancer Observatory, «Breast cancer statistics worldwide,» World Health Organization, 2019.
- [19] A. Di Sibio, G. Abriata, D. Forman y M. Sierra, «Female breast cancer in Central and South America,» *Female breast cancer in Central and South America*, pp. 110-120, 09 2016.
- [20] J. Ferlay, I. Soerjomataram, R. Dikshit, S. Eser, C. Mathers, M. Rebelo, D. Maxwell, D. Forman y F. Bray, «Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012,» *International Journal of Cancer*, pp. 359-386, 13 09 2014.
- [21] Ministerio de Salud y Protección Social; Instituto de Evaluación Tecnológica en Salud; Instituto Nacional de Cancerología, «Guía de Práctica Clínica para la detección temprana, tratamiento integral, seguimiento y reanilitación del cáncer de mama,» 2017. [En línea]. Available: http://gpc.minsalud.gov.co/gpc_sites/Repositorio/Conv_500/GPC_cancer_mama/gpc_cancer_mama_completa.aspx.
- [22] L. Acuña, A. Sánchez, L. Soler, F. Valderrama, M. Daza, L. Moreno, P. Ramírez, A. Niño y A. Rodríguez, «Lucha contra el cáncer de mama,» *Boletín de información Técnica Especializada de la Cuenta de Alto Costo.*, vol. 3, nº 18, pp. 1-5, 19 10 2017.
- [23] G. Sharma, R. Dave, J. Sanadya, P. Sharma y K. Sharma, «Various types and management of breast cancer: an overview.,» *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology and Research*, vol. 2, nº 1, pp. 109-126, 2010.
- [24] M. Roland-Mieszkowsk, «Cancer - A Biophysicist's Point of View,» Digital Recordings, Halifax, 2004.
- [25] A. Santaballa, «Cáncer de mama,» Sociedad Española de Oncología Médica, Madrid, 2017.
- [26] M. A. Kosir, «Breast Cancer,» Merck & Co., Inc., Kenilworth, 2018.
- [27] F. Imigo, E. Mansilla, I. Delama, M. T. Poblete y C. Fonfach, «Clasificación molecular del cáncer de mama,» *Cuadernos de cirugía*, vol. 25, pp. 67-74, 2011.

- [28] M. Arrechea-Irigoyen, F. Vicente-García, A. Córdoba-Iturriagagoitia, B. Ibáñez-Beroiz, M. Santamaría-Martínez y F. Guillén-Grima, «Subtipos moleculares del cáncer de mama: implicaciones pronósticas y características clínicas e inmunohistoquímicas,» *Anales del Sistema Sanitario de Navarra*, vol. 34, nº 2, pp. 219-233, 2011.
- [29] S. K. Al-Ghazal, L. Fallowfield y R. W. Blamey, «Comparison of psychological aspects and patient satisfaction following breast conserving surgery, simple mastectomy and breast reconstruction.,» *European Journal of Cancer*, vol. 36, nº 15, pp. 1938-1943, 2000.
- [30] Asociación Española Contra el Cáncer, «Cáncer de mama,» AECC, Madrid, 2014.
- [31] M. Clarke, R. Collins, S. Darby, C. Davies, P. Elphinstone, V. Evans, J. Godwin, R. Gray, C. Hicks, S. James, E. MacKinnon, P. McGale, T. McHugh, R. Peto, C. Taylor y Y. Wang, «Effects of radiotherapy and of differences in the extent of surgery for early breast cancer on local recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials.,» *The Lancet*, vol. 366, nº 9503, pp. 2087-2106, 2005.
- [32] J. Tao, K. Visvanathan y A. Wolf, «Long term side effects of adjuvant chemotherapy in patients with early breast cancer.,» *Breast*, vol. 24, nº 2, pp. 149-153, 2015.
- [33] American Cancer Society, Inc, «Treating Breast Cancer,» 26 9 2017. [En línea]. Available: <https://www.cancer.org/cancer/breast-cancer/treatment/hormone-therapy-for-breast-cancer.html>.
- [34] National Institutes of Health, «Hormone Therapy for Breast Cancer,» 14 2 2017. [En línea]. Available: <https://www.cancer.gov/types/breast/breast-hormone-therapy-fact-sheet>.
- [35] K. Holland y M. Bien, «Breast Cancer Hormone Therapy: How It Works, Side Effects, and More,» 8 9 2016. [En línea]. Available: <https://www.healthline.com/health/breast-cancer-hormone-therapy-how-it-works-side-effects-more>.
- [36] K. V. Reddy, R. Yedery y C. Aranha, «Antimicrobial peptides: premises and promises.,» *International Journal of Antimicrobial Agents*, vol. 24, nº 6, pp. 536-547, 2004.

- [37] M. Mahlapuu, J. Håkansson, L. Ringstad y C. Björn, «Antimicrobial Peptides: An Emerging Category of Therapeutic Agents,» *Frontiers in cellular and infection microbiology*, vol. 6, pp. 1-12, 2016.
- [38] D. Hoskin y A. Ramamoorthy, «Studies on anticancer activities of antimicrobial peptides,» *Biochimica et Biophysica Acta* 1778, pp. 357-375, 2008.
- [39] G. Wang, B. Mishra, K. Lau, T. Lushnikova, R. Golla y X. Wang, «Antimicrobial Peptides in 2014,» *Pharmaceuticals*, nº 8, pp. 123-150, 2015.
- [40] T. Iwasaki, J. Ishibashi, H. Tanaka, M. Sato, A. Asaoka, D. Taylor y M. Yamakawa, «Selective cancer cell cytotoxicity of enantiomeric 9-mer peptides derived from beetle defensins depends on negatively charged phosphatidylserine on the cell surface,» *Peptides*, pp. 660-668, 2009.
- [41] B. Deslouches y Y. P. Di, «Antimicrobial peptides with selective antitumor mechanisms: prospect for anticancer applications,» *Oncotarget*, vol. 28, nº 8, p. 46635–46651, 2017.
- [42] W. Shoombuatong, N. Schaduengrat y C. Nantasenamat, «Unraveling the bioactivity of anticancer peptides as deduced from machine learning.,» *Journal of experimental and clinical sciences*, vol. 17, p. 734–752, 2018.
- [43] Y. Yoo, S. R. Watanabe, K. Watanabe, K. Hata, K. Shimazaki y I. Azuma, «Bovine lactoferrin and lactoferricin, a peptide derived from bovine lactoferrin, inhibit tumor metastasis in mice,» *Japanese Journal of Cancer*, vol. 88, pp. 184-190, 1997.
- [44] M. Kentaro, S. Yasushi, H. Yoshihiko, N. Yuko y M. Yasuki, «Protein-surfactant interactions between bovine lactoferrin and sophorolipids under neutral and acidic conditions,» *Biochemistry and Cell Biology*, vol. 95, nº 1, pp. 126-132, 2017.
- [45] L. Barreto, «Efecto de la lactoferrina bovina en la invasión de *Salmonella typhimurium* cepa SL 1344 a células HEP-2,» Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, 2017.
- [46] M. Drago, «Lactoferrina: producción industrial y aplicaciones,» *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, vol. 38, nº 3, pp. 30-38, 2007.

- [47] R. Jiang y B. Lönnnerdal, «Bovine lactoferrin and lactoferricin exert antitumor activities on human colorectal cancer cells (HT-29) by activating various signaling pathways,» *Biochemistry & Cell Biology*, vol. 95, p. 99–109, 2017.
- [48] A. Richardson, R. de Antueno, R. Duncan y D. W. Hoskin, «Intracellular delivery of bovine lactoferricin's antimicrobial core (RRWQWR) kills T-leukemia cells,» *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 388, nº 4, pp. 736-741, 2009.
- [49] V. Solarte, «Péptidos derivados de la lactoferricina bovina como agentes anticancerígenos contra el carcinoma de células escamosas de la cavidad oral,» Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, 2016.
- [50] J. S. Mader, J. Salsman, D. M. Conrad y D. W. Hoskin, «Bovine lactoferricin selectively induces apoptosis in human leukemia and carcinoma cell lines,» *Molecular Cancer Therapeutics*, vol. 4, nº 4, pp. 612-624, 2005.
- [51] A. Solarte, P. Conget, J. Vernott, J. Rosas, J. García, Z. Rivera y M. Arango, «A tetrameric peptide derived from bovine lactoferricin as a potential therapeutic tool for oral squamous cell carcinoma: A preclinical model,» *PLOS ONE*, pp. 1-17, 2017.
- [52] V. A. Solarte, J. E. Rosas, Z. J. Rivera, M. L. Arango-Rodríguez, J. E. García y J.-P. Vernot, «A Tetrameric Peptide Derived from Bovine Lactoferricin Exhibits Specific Cytotoxic Effects against Oral Squamous-Cell Carcinoma Cell Lines,» *BioMed Research International*, pp. 1-13, 2015.
- [53] Y. Vargas, J. Rodríguez, Y. Umañana, A. Leal, G. Almanzar, J. Garcia y Z. Rivera, «Antibacterial Synthetic Peptides Derived from Bovine Lactoferricin Exhibit Cytotoxic Effect against MDA-MB-468 and MDA-MB-231 Breast Cancer Cell Lines,» *Molecules*, pp. 1-11, 2017.
- [54] J. Rodríguez Guerra, A. Barragán Cárdenas, A. Ochoa-Zarzosa, J. López Meza, A. Umaña Pérez, R. Fierro-Medina, Z. J. Rivera Monroy y J. E. García Castañeda, «The tetrameric peptide LfcinB (20–25)₄ derived from bovine lactoferricin induces apoptosis in the MCF-7 breast cancer cell line,» *RSC Advances*, vol. 9, p. 20497–20504, 2019.
- [55] R. Fine, P. Brandt-Rouf y Y. Mao..Estados Unidos Patente 7,772,367, 2005.

- [56] L. Migliolo, M. R. Felício, M. H. Cardoso, O. N. Silva, M.-A. E. Xavier, D. O. Nolasco, A. S. de Oliveira, I. Roca-Subira, J. V. Estape, L. D. Teixeira, S. M. Freitas, A. J. Otero-Gonzalez, S. Gonçalves, N. C. Santos y O. L. Franco, «Structural and functional evaluation of the palindromic alanine-rich antimicrobial peptide Pa-MAP2,» *Biochimica et Biophysica Acta journal*, vol. 1858, nº 7, p. 1488–1498, 2016.
- [57] C. Sun, Y. Li, S. Cao, H. Wang y C. Jiang, «Antibacterial Activity and Mechanism of Action of Bovine Lactoferricin Derivatives with Symmetrical Amino Acid Sequences,» *Internationa Journal of Molecular Sciences*, vol. 19, pp. 1-20, 2018.
- [58] M. B. Strøm, B. E. Haug, M. L. Skar, W. Stensen, T. Stiberg y J. Svendsen, «The Pharmacophore of Short Cationic Antibacterial Peptides,» *Journal of medicinal chemistry*, pp. 1567-1570, 2003.
- [59] K. Burns, T. McCleery y D. Thévenin, «pH-Selective Cytotoxicity of pHLIP-Antimicrobial Peptide Conjugates,» *Scientific Reports*, pp. 1-10, 2016.
- [60] J. Rodriguez, «Evaluación De La Actividad Anticancerígena In Vitro De Péptidos Sintéticos Derivados De Lactoferricina Bovina En Líneas Celulares De Cáncer De Mama,» Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, 2019.
- [61] J. Oh, S. Y. Hong y K. H. Lee, «Structure-activity relationship study : short antimicrobial peptides,» *The Journal of Peptide Research*, vol. 53, nº 1, pp. 41-46, 1999.
- [62] B. Pignataro, *New Strategies in Chemical Synthesis and Catalysis*, John Wiley & Sons, Incorporated, 2012.
- [63] A. Guarna y A. Trabocchi, *Peptidomimetics in Organic and Medicinal Chemistry*, John Wiley & Sons, Incorporated, 2014.
- [64] A. Beck-sickiniger, H. Weiland, H. Wittneben, K. Willim y K. J. G. Rudolf, «Complete L-alanine scan of neurpeptide y reveals ligands binding to Y1 and Y2 receptors with distinguished conformations,» *European Journal of Biochemistry*, pp. 947-958, 1994.
- [65] American Type Culture Collection, «MDA-MB-468 (ATCC® HTB-132™),» 2016. [En línea]. Available: <https://www.atcc.org/Products/All/HTB-132.aspx#culturemethod..>

- [66] X. Dai, H. Cheng, Z. Bai y J. Li, «Breast Cancer Cell Line Classification and Its Relevance with Breast Tumor Subtyping,» *Journal of Cancer*, vol. 16, nº 8, pp. 3131-3141, 2017.
- [67] American Type Culture Collection, «MDA-MB-231 (ATCC® HTB-26™),» 2018. [En línea]. Available: <https://www.atcc.org/Products/All/HTB-26.aspx#documentation>.
- [68] American Type Culture Collection, «MCF7 (ATCC® HTB-22™),» 2016. [En línea]. Available: <https://www.atcc.org/Products/All/HTB-22.aspx#documentation>.
- [69] M. Lacroix y G. Leclercq, «Relevance of breast cancer cell lines as models for breast tumours: an update,» *Breast Cancer Research and Treatment*, vol. 83, p. 249–289, 2004.
- [70] D. Wu, Y. Gao, Y. Qi, L. Chen, Y. Ma y Y. Li, «Peptide-based cancer therapy: Opportunity and challenge,» *Cancer Letters*, pp. 13-22, 2014.
- [71] X. Ke y L. Shen, «Molecular targeted therapy of cancer: The progress and future prospect,» *Frontiers in Laboratory Medicine*, pp. 69-75, 2017.
- [72] J. van Meerloo, G. Kaspers y J. Cloos, «Cell Sensitivity Assays: The MTT Assay,» de Cree, I, Springer Science+Business Media, 2011, pp. 237-245.
- [73] BioLegend, «FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit with 7-AAD,» 30 11 2012. [En línea]. Available: [https://www.biolegend.com/en-gb/global-elements/pdf-popup/fitc-annexin-v-apoptosis-detection-kit-with-7-aad-8264?filename=FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit with 7-AAD.pdf&pdfgen=true](https://www.biolegend.com/en-gb/global-elements/pdf-popup/fitc-annexin-v-apoptosis-detection-kit-with-7-aad-8264?filename=FITC%20Annexin%20V%20Apoptosis%20Detection%20Kit%20with%207-AAD.pdf&pdfgen=true).
- [74] Invitrogen, «TRIzol reagent,» Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, 2016.
- [75] P. Chomczynski y N. Sacchi, «Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction,» *Analytical Biochemistry*, pp. 156-159, 1987.
- [76] N. d. J. Huertas, Z. J. Rivera Monroy, R. Fierro Medina y J. E. García Casañeda, «Antimicrobial Activity of Truncated and Polyvalent Peptides Derived from the FKRRQWQWRMKKGLA Sequence against Escherichia coli ATCC 25922 and Staphylococcus aureus ATCC 25923,» *Molecules*, vol. 22, nº 6, 2017.

- [77] S. Reißer, E. Strandberg, T. Steinbrecher y A. Ulrich, «3D Hydrophobic Moment Vectors as a Tool to Characterize the Surface Polarity of Amphiphilic Peptides,» *Biophysical Journal*, vol. 106, pp. 2385-2394, 2016.
- [78] M. Jaimes Melo, «PREDICCIÓN IN-SILICO DE LA ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DE LA PROTEÍNA HIPOTÉTICA p284 DE Trypanosoma cruzi,» PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA, Bogotá, 2012.
- [79] N. Yang, M. B. Strøm, S. M. Mekonnen, J. S. Svendsen y Ø. Rekdal, «The Effects of Shortening Lactoferrin Derived Peptides against Tumour Cells, Bacteria and Normal Human Cells,» *Journal of Peptide Science*, vol. 10, p. 37-46, 2004.
- [80] J. H. Kang, M. K. Lee, K. L. Kim y K. S. Hahm, «Structure-biological activity relationships of 11-residue highly basic peptide segment of bovine lactoferrin,» *International Journal of Peptide and Protein Research*, vol. 4, nº 357-363, p. 48, 1996.
- [81] S. Farnaud y R. Evans, «Lactoferrin - a multifunctional protein with antimicrobial properties,» *Molecular Immunology*, vol. 40, nº 7, pp. 395-405, 2003.
- [82] L. T. Eliassen, G. Berge, A. Leknessund, M. Wikman, I. Lindin, C. Løkke, F. Ponthan, J. I. Johnsen, B. Sveinbjørnsson, P. Kogner, T. Flægstad y Ø. Rekdal, «The antimicrobial peptide, Lactoferricin B, is cytotoxic to neuroblastoma cells in vitro and exhibits xenograft growth in vivo,» *International Journal of Cancer*, vol. 119, p. 493-500, 2006.
- [83] Molecular Probes, «MitoProbe™ JC-1 Assay Kit for Flow Cytometry (M34152),» ThermoFisher Scientific, Eugene, 2011.
- [84] A. Roseto y C. Brenner, «Apoptosis o la muerte celular programada,» *Archivos Argentinos de Pediatría*, pp. 253-275, 1999.
- [85] J. A. Gibbon, J. R. Kanwar y R. K. Kanwar, «Iron-free and iron-saturated bovine lactoferrin inhibit survivin expression and differentially modulate apoptosis in breast cancer,» *BMC Cancer*, vol. 15, 2015.
- [86] M. Á. Ramírez-García, H. Márquez-González, G. Barranco-Lampón y J. E. López-Aguila, «Bcl-2: su papel en el ciclo celular, apoptosis y cáncer,» *El Residente*, vol. 9, nº 3, pp. 84-94, 2014.

- [87] L. K. Leung y T. T. Wang, «Bcl-2 Is Not Reduced in the Death of MCF-7 Cells at Low Genistein Concentration,» *The Journal of Nutrition*, vol. 130, nº 12, p. 2922–2926, 2000.

- [88] N. Pilco-Ferreto y G. M. Calaf, «Influence of doxorubicin on apoptosis and oxidative stress in breast cancer cell lines,» *INTERNATIONAL JOURNAL OF ONCOLOGY*, vol. 49, pp. 753-762, 2016.